

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 21 October 1997 (21.10.97)	
International application No. PCT/DE97/00458	Applicant's or agent's file reference A 2953
International filing date (day/month/year) 07 March 1997 (07.03.97)	Priority date (day/month/year) 07 March 1996 (07.03.96)
Applicant ROSE-JOHN, Stefan	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

02 October 1997 (02.10.97)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Aino Metcalfe
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

COMMUNICATION OF
INTERNATIONAL APPLICATIONS

(PCT Article 20)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing:

05 February 1998 (05.02.98)

in its capacity as designated Office

The International Bureau transmits herewith copies of the international applications having the following international application numbers and international publication numbers:

International application no.:

PCT/DE97/00458

International publication no.:

WO97/32891

**CORRECTED VERSION
VERSION CORRIGEE**The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra
Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

COMMUNICATION OF
INTERNATIONAL APPLICATIONS

(PCT Article 20)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as designated Office

Date of mailing:

19 March 1998 (19.03.98)

The International Bureau transmits herewith copies of the international applications having the following international application numbers and international publication numbers:

International application no.:

PCT/DE97/00458

International publication no.:

WO97/32891

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

14 September 1998 (14.09.98)

International application No.

PCT/DE97/00458

International filing date (day/month/year)

07 March 1997 (07.03.97)

Applicant

ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Jean-Marie McAdams

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

HUBER, Bernard
Huber & Schüssler
Truderinger-Strasse 246
D-81825 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 19 March 1998 (19.03.98)		
Applicant's or agent's file reference A 2953		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/DE97/00458	International filing date (day/month/year) 07 March 1997 (07.03.97)	
Priority date (day/month/year) 07 March 1996 (07.03.96)		
Applicant ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
EP,JP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
None

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
12 September 1997 (12.09.97) under No. WO 97/32891

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/32891 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. September 1997 (12.09.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00458 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. März 1997 (07.03.97) (30) Prioritätsdaten: 196 08 813.5 7. März 1996 (07.03.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH [DE/DE]; Rischerstrasse 12, D-69123 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ROSE-JOHN, Stefan [DE/DE]; I. Medizinische Klinik - Abt. Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Obere Zahlbacherstrasse 63, D-55101 Mainz (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger-Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: CONJUGATE FOR MODIFYING INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS (54) Bezeichnung: KONJUGAT ZUR BEEINFLUSSUNG VON WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PROTEINEN (57) Abstract The present invention concerns a conjugate comprising two polypeptides with a mutual affinity and connected via a linker. It also concerns the use of such a conjugate to modify interactions between proteins. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Konjugats zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

"Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen"

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, daß sich zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen eignet, eine ein solches Konjugat kodierende DNA und die Verwendung des Konjugats.

Viele Vorgänge in einem Organismus beruhen auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen. Beispiele solcher Wechselwirkungen finden sich bei Rezeptoren und den an sie bindenden Liganden. Oftmals sind allerdings die Wechselwirkungen zwischen Proteinen gestört. Dies kann daran liegen, daß einzelne an den Wechselwirkungen beteiligte Proteine modifiziert sind, wodurch ihre Affinität zu anderen, ebenfalls beteiligten Proteinen verändert ist. Auch können einzelne an den Wechselwirkungen beteiligte Proteine fehlen. Dies findet man z.B. bei Zellen, die nicht auf Interleukin-6 (IL-6) reagieren. Solche Zellen weisen einen unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor auf, d. h. dieser Rezeptor umfaßt lediglich die intrazelluläre, Signal-auslösende Untereinheit gp130, nicht aber die extrazelluläre, IL-6 bindende Untereinheit (IL-6R).

Viele Versuche werden unternommen, gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beheben. Beispielsweise wird dies bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor durch Verabreichung von IL-6 (50 ng/ml) und löslichem IL-6R (sIL-6R) (1280 ng/ml) versucht. Die Bereitstellung von sIL-6R bedingt jedoch einen großen Kosten- und Zeitaufwand, da sIL-6R nur biologisch aktiv ist, wenn es aus eukaryotischen Zellen stammt, und die Erträge aus solchen im Bereich von 1-6 mg sIL-6R/l liegen. Die genannte Verabreichung stellt somit kein geeignetes Mittel dar, dauerhaft die gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor zu beheben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen, insbesondere bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor, behoben werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck "eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide" betrifft Polypeptide jeglicher Art, Herkunft und Länge, die eine Affinität zueinander aufweisen. Zwei solcher Polypeptide liegen in einem erfindungsgemäßen Konjugat vor. Eines dieser Polypeptide kann ein Rezeptor und das andere ein an den Rezeptor bindender Ligand sein. Der Rezeptor kann in Form seiner Untereinheit bzw. des funktionellen Teils davon vorliegen, die den Liganden binden. Ebenso kann der Ligand in Form seiner Untereinheit bzw. des funktionellen Teils davon vorliegen, die den Rezeptor binden. Vorzugsweise ist der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor, insbesondere ein Rezeptor für Lymphokine, Monokine, Interferone, "colony stimulating factors" oder Interleukine. Besonders bevorzugt ist der Rezeptor ein Interleukin-6-Rezeptor oder ein CNTF-Rezeptor. Entsprechendes gilt für den Liganden. Dieser ist vorzugsweise ein Zytokin, insbesondere ein Lymphokin, Monokin, Interferon, "colony stimulating factor" oder Interleukin. Besonders bevorzugt ist der Ligand ein Mitglied der Interleukin-6-Familie, insbesondere IL-6, IL-11, CNTF, OSM, LIF oder CT-1. Der Rezeptor und der Ligand können Wildtyp-Sequenzen oder hiervon durch ein oder mehrere Nukleotide unterschiedliche Sequenzen umfassen. Dadurch können der Rezeptor und der Ligand verbesserte und/oder neue Eigenschaften aufweisen. Verbesserte Eigenschaften können z.B. darin liegen, daß die Bindung zwischen dem Rezeptor und dem Ligand verbessert ist. Neue Eigenschaften können z.B. darin liegen, daß der Ligand ein verändertes Verhalten zu Proteinen zeigt, mit denen er nach Bindung an den Rezeptor reagiert. Beispielsweise kann IL-6 dahingehend verändert sein, daß es eine stärkere Bindung an den IL-6-Rezeptor hat, das Protein gp130 aber nicht mehr aktivieren kann. In einem solchen Fall umfaßt IL-6 vorzugsweise die Sequenz von Fig. 3 oder Fragmente davon. Vorstehende Ausführungen hinsichtlich einer Verände-

rung der Wildtyp-Sequenz eines Rezeptors bzw. eines Liganden gelten entsprechend für deren Untereinheiten und funktionellen Teile davon, die zu einer gegenseitigen Bindung beitragen.

Der Ausdruck "Linker" betrifft Linker jeglicher Art, die sich zur Verbindung von Polypeptiden eignen. Beispiele solcher Linker sind bifunktionelle, chemische Cross-Linker, z.B. DPDPB. Ferner kann der Linker eine durch die beiden Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke sein. Desweiteren kann der Linker ein Polypeptid sein.

In bevorzugter Ausführungsform ist ein vorstehendes Konjugat ein Fusionspolypeptid. In diesem können die zwei, eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide miteinander fusioniert sein und der Linker einer durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke darstellen. Vorzugsweise ist der Linker ein Polypeptid, das die zwei anderen Polypeptide miteinander verbindet. Beispiele letzteren Fusionspolypeptids sind in den Figuren 1 und 2 angegeben. Diese Fusionspolypeptide umfassen ein humanes sIL-6R-Polypeptid, d.h. die extrazelluläre Untereinheit eines Interleukin-6-Rezeptors, und ein humanes IL-6-Polypeptid, wobei die Polypeptide über unterschiedliche Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind. Diese Fusionspolypeptide werden mit H-IL-6 bezeichnet. Eine Variation von H-IL-6, die von dem sIL-6R-Polypeptid nur die Aminosäuren Pro 114 bis Ala 323 enthält, wird ebenfalls bereitgestellt. Ferner wird eine Variation von H-IL-6 bereitgestellt, welche die Aminosäuren 113 bis 323 des sIL-6R-Polypeptids und die Aminosäuren 29 bis 212 des IL-6-Polypeptids umfaßt. Desweiteren wird ein Fusionspolypeptid H-IL-6 bereitgestellt, dessen IL-6-Polypeptid die Sequenz von Fig. 3 umfaßt. Das sIL-6R-Polypeptid dieses Fusionspolypeptids umfaßt eine vollständige Sequenz bzw. die Sequenz zwischen den Aminosäuren 113 (114) bis 323 eines sIL-6R-Polypeptids. Darüberhinaus wird ein Fusionspolypeptid bereitgestellt, das die extrazelluläre Untereinheit eines humanen CNTF-Rezeptors und humanes CNTF umfaßt, wobei beide Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein vorstehendes Fusionspolypeptid kodierende DNA. Vorzugsweise kodiert die DNA für ein Fusionspolypeptid, bei dem die zwei, eine Affinität zueinander aufweisenden Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind. Ein Beispiel letzterer DNA ist in Fig. 1 angegeben. Diese DNA wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als CDM8-H-IL-6 unter DSM 10549 am 27. 2. 1996 hinterlegt.

Eine erfindungsgemäße DNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100, Ycpad1 und Vektoren für *Pichia pastoris* zu nennen, wobei letztere bevorzugt sind, während für die Expression in tierischen Zellen, die in einem Organismus oder außerhalb eines solchen vorliegen können, z.B. pKCR, pEFBOS, pCEV4 und pCDM8 angegeben sind, wobei letzterer bevorzugt ist. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A. Der Fachmann wird berücksichtigen, daß für die Expression einer erfindungsgemäßen, sIL-6R-Sequenzen enthaltenden, DNA Vektoren angeraten sind, die eine Expression in eukaryotischen Zellen ermöglichen.

Ferner kennt der Fachmann geeignete Zellen, um eine erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E.coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*, wobei letzterer bevorzugt ist, die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, Vero, HeLa und COS, wobei letztere bevorzugt sind, sowie die Insektenzellen sf9.

Desweiteren weiß der Fachmann, in welcher Weise eine erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Auch kennt er Bedingungen, Zellen zu transformieren bzw. transfizieren und diese dann zu kultivieren. Darüberhinaus sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA

exprimierte Fusionspolypeptid zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Fusionspolypeptid gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden Fusionspolypeptid zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen Fusionspolypeptid erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beeinflussen. Dies kann durch die Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate wie auch durch den Einsatz erfindungsgemäßer DNA in einer Gentherapie erfolgen. Insbesondere können die gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor behoben werden. Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß sie kostengünstig eingesetzt werden kann. Dies zeigt sich insbesondere in der Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate zur Beeinflussung der gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor.

Ferner eignet sich die vorliegende Erfindung zur *ex vivo* Expansion von Stammzellen, insbesondere humanen Stammzellen. Besonders bemerkenswert ist es dabei, daß mit einem erfindungsgemäßen Konjugat H-IL-6 mehr Stammzell-Kolonien im Soft-Agar erhalten werden, als dies mit den einzelnen Komponenten IL-6 und sIL-6R möglich ist. Die vorliegende Erfindung stellt somit auch einen wichtigen Beitrag dar, gezielt in die Bildung von Blutzellen einzugreifen.

Desweiteren stellt die vorliegende Erfindung mit einem Fusionspolypeptid H-IL-6, das als IL-6-Polypeptid die Sequenz von Fig. 3 umfaßt, ein Mittel bereit, das sich

als IL-6-Rezeptor-Antagonist eignet. Ein solches Mittel ist von hohem therapeutischen Wert.

Die Durchführung der vorliegenden Erfindung kann durch die erfindungsgemäßen Antikörper überwacht werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

- Fig. 1 zeigt die Aminosäure (DNA)-sequenz eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6. Sequenzen für das Restriktionsenzym Sall (GTCGAC), das Signalpeptid (MLAVGCALLAALLAAPGAA) und den Linker (RGGGGSGGGGSGGGGSVE) sind angegeben. Der Linker verbindet den COOH-Terminus von humanem sIL-6R mit dem NH₂-Terminus von humanem IL-6.
- Fig. 2 zeigt die Aminosäure (DNA)-sequenz eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6. Sequenzen für das Restriktionsenzym Sall (GTCGAC), das Signalpeptid (MLAVGCALLAALLAAPGAA) und den Linker (RGGGGSGGGGSGGGGSVE) sind angegeben. Der Linker verbindet den COOH-Terminus von humanem sIL-6R mit dem NH₂-Terminus von humanem IL-6.
- Fig. 3 zeigt die Aminosäuresequenz des in einem erfindungsgemäßen Fusionspolypeptid H-IL-6 vorliegenden IL-6-Polypeptids.
- Fig. 4 zeigt die Expansions- und Koloniebildungsfähigkeit eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung einer erfindungsgemäßen DNA

Es wurde die DNA von Fig. 1 hergestellt. Dazu wurde humane IL-6R cDNA (Schooltink et al., Biochem. J. (1991) 277, 659-664) verwendet. Diese cDNA wurde in das Expressionsplasmid pCDM8 über die Restriktionsstelle Xho I einkloniert (Müllberg et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 473-480). Mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde unter Verwendung der Primer (1) (pCDM8 5' Primer: 5' TAATACGACTCACTATAGGG3') und Primer (2) (sIL-6R 3' Primer: 5'CCGCTCGAGCTGGAGGACTCCTGGA 3') bei Standardbedingungen ein sIL-6R Fragment generiert, das nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xho I in das geöffnete Plasmid pCDM8 einkloniert wurde. Es entstand das Plasmid pCDM8-sIL-6R. Anschließend wurde eine zweite PCR Reaktion mit IL-6 cDNA, die ebenfalls in das Expressionsplasmid pCDM8 unter Verwendung von Xho I einkloniert worden war, durchgeführt. Es wurden die Primer (3) (IL-6-5' Primer: 5' CGGCTCGAGCCAGTACCCCCAGGAGAA3') und Primer (4) (pCDM8 3' Primer: 5'CCACAGAAGTAAGGTTCTT3') verwendet. Das PCR Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Xho I und Not I geschnitten und in das Plasmid pCDM8-sIL-6R einkloniert. Es entstand das Plasmid pCDM8-sIL-6R-IL-6. Anschließend wurde ein synthetischer Linker hergestellt, der aus zwei Oligonukleotiden bestand: Primer (5) (5'TCGAGGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTG3') und Primer (6) (5'TCGACAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCC3'. Die Oligonukleotide (5) und (6) wurden nach Standardmethoden zu einem Doppelstrang zusammengefügt und anschließend in das mit dem Restriktionsenzym Xho I verdaute Plasmid pCDM8-sIL-6R-IL-6 einkloniert. Es entstand das Plasmid pCDM8-H-IL-6.

Beispiel 2: Herstellung einer erfindungsgemäßen DNA

Es wurde die DNA von Fig. 2 hergestellt. Hierzu wurde vorgegangen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Als Primer (5) und (6) wurden jedoch verwendet: Primer (5) (5'TCGAGGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTG3') und Primer (6)

(5'TCGACAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCC3'. Es wurde das Plasmid pCDM8-H-IL-6-(2) erhalten.

Beispiel 3: Expression eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids

5

10

15

COS-7-Zellen wurden mit pCDM8-H-IL-6 von Beispiel 1 bzw. pCDM8-H-IL-6(2) von Beispiel 2 mit Hilfe der Elektroporation transfiziert. Es wurden 10^7 COS-7 Zellen mit $20\mu\text{g}$ Plasmid mit Hilfe eines Gene-Pulsers (Bio-Rad) bei $960\mu\text{F}$ und 230 V elektroporiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen metabolisch mit [^{35}S]-Cystein/Methionin 4 h radioaktiv markiert und 2 h mit nicht radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert. Der Überstand aus Zellysat und Zellüberstand wurde nach Standardmethoden (Müllberg et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 473-480) mit einem anti-IL-6 Antikörper immunpräzipitiert und nach SDS-Gelelektrophorese durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Transfizierte COS-7 Zellen sezernierten ein 70-75 kDa Protein, das von einem anti-IL-6 Antikörper erkannt und nicht von untransfizierten Zellen gebildet wurde.

20

Überstände von transfizierten COS-7 Zellen wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem anti-IL-6 Antikörper detektiert. Wiederum exprimierten transfizierte COS-7 Zellen ein 70-75 kDa Protein, das von einem anti-IL-6 Antikörper erkannt wurde.

25

Überstände von transfizierten COS-7 Zellen wurden mit Hilfe eines kommerziellen ELISA auf IL-6 (CLB, Amsterdam) und sIL-6R (Seromed, Gießen) untersucht. Mit beiden ELISAs wurde H-IL-6 detektiert. Die Konzentration von H-IL-6 im Zellüberstand betrug etwa $1\mu\text{g/ml}$.

Beispiel 4: Stimulation der Haptoglobin-Expression durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid

30

Es wurden die humanen Hepatomazelllinien HepG2, HepG2-IL-6 und HepG2-PDI verwendet.

HepG2 Zellen (ATCC HB 8065) werden durch IL-6, nicht aber durch sIL-6R stimuliert, Haptoglobin zu exprimieren.

5 HepG2-IL-6 Zellen wurden durch stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem humanen IL-6-Expressionsplasmid erhalten. Diese Zellen regulieren aufgrund der IL-6 Expression endogenes IL-6R herunter und exprimieren somit kein IL-6R. HepG2-IL-6 Zellen werden nicht durch IL-6, aber durch sIL-6R stimuliert, Haptoglobin zu exprimieren.

10 HepG2-PDI Zellen wurden durch stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem humanen IL-6-Expressionsplasmid erhalten. Hierzu wies das Expressionsplasmid eine IL-6 cDNA auf, durch die das exprimierte IL-6 Protein ein COOH-terminales Retentionssignal für das Endoplasmatische Retikulum (ER) enthielt. Daraus resultierte, daß diese Zellen nicht durch das exprimierte IL-6, sondern
15 auch IL-6R im ER zurückhielten. Im Gegensatz zu HepG2-IL-6 Zellen sezernieren aber HepG2-PDI Zellen kein IL-6 und können nur durch die Kombination von IL-6 und sIL-6R stimuliert werden, Haptoglobin zu exprimieren.

20 Die vorstehenden Hepatomazelllinien wurden nach Standardbedingungen in 96er Zellkulturplatten kultiviert (Rose-John et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 22084-22091). Die Zellen wurden mit IL-6, sIL-6R, IL-6 + sIL-6R bzw. Zellüberständen aus mit pCDM8-H-IL-6, pCDM8-H-IL-6(2) bzw. pCDM8 transfizierten COS-7 Zellen von Beispiel 3 18 h stimuliert. Der Zellüberstand wurde geerntet und die Haptoglobinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt (vgl. Tabelle I).

25

30

Tabelle I

Stimulation der Haptoglobin-Expression

	IL-6	sIL-6R	IL-6 + sIL-6R	H-IL-6	Kontrolle
HepG2	+	-	++	+++	-
HepG2-IL-6	-	++	++	+++	-
HepG2-PDI	-	-	++	+++	-

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid, H-IL-6, in der Lage ist, die Expression von Haptoglobin in Zellen zu stimulieren, d.h. die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beeinflussen.

Beispiel 5: Expansion und Koloniebildung von humanen CD34⁺-Zellen durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid

Aus humanem Knochenmark bzw. aus Blut von Patienten, deren Stammzellen durch Injektion von G-CSF mobilisiert worden waren, wurden Zellen isoliert, die den Oberflächenmarker CD34 exprimieren. 6000 dieser Zellen wurden in 3ml Medium in Zellkulturgefäße platiert. Nach zwei Wochen zeigte es sich, daß eine Inkubation der Zellen mit den Zytokinen SCF, IL-3 und H-IL-6 (erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid), wie auch mit SCF, IL-3 und IL-6 eine starke Proliferation verursachte. Von den entstandenen Zellen wurden 1000 Zellen in neue Zellkulturgefäße platiert. Nach zwei Wochen in einem standardisierten Kolonie-Induktions-Versuch waren die mit SCF, IL-3 und H-IL-6 behandelten Zellen in der Lage, etwa dreimal mehr Kolonien zu bilden als mit SCF, IL-3 und IL-6 behandelte Zellen.

Dieses Ergebnis zeigt, daß Zellen, die durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid H-IL-6 stimuliert wurden, ein höheres koloniebildendes Potential besitzen als durch IL-6 stimulierte Zellen (vgl. Fig. 4).

Patentansprüche

1. Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind.
- 5 2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das eine Polypeptid ein Rezeptor und das andere ein den Rezeptor bindender Ligand ist.
3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor in Form seiner den Liganden bindenden Untereinheit vorliegt.
- 10 4. Konjugat nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand in Form seiner den Rezeptor bindenden Untereinheit vorliegt.
5. Konjugat nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor und der Ligand ein Zytokin ist.
- 15 6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein IL-6 Rezeptor und das Zytokin ein IL-6 ist.
7. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein CNTF-Rezeptor und das Zytokin ein CNTF ist.
- 20 8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke ist.
- 25 9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein bifunktioneller, chemischer Cross-Linker ist.
10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat ein Fusionspolypeptid ist.
- 30

11. Konjugat nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein Polypeptid ist, das die zwei anderen Polypeptide miteinander verbindet.
12. DNA, kodierend für das Konjugat nach Anspruch 10 oder 11.
13. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 12.
14. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 13.
15. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 - 11 und der DNA nach Anspruch 12 zur Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

Fig. 1

1	GTCGACGCGATGGAGTGTAGCCGAGGAGGAAGC																			ATG	CTG	GCC	GTC	GGC	TGC	CGG	CTG	CTG	GCT	63	
1	M L A V G C A L L A																														10
64	GCC	CTG	CTG	GCC	GCG	CCG	GGA	GCG	GCG	CTG	GCC	CCA	AGG	CGC	TGC	CCT	CGG	CAG	GAG	GTG	123										
11	A L L A A P G A L A																			30											
124	GCA	AGA	GGC	GTG	CTG	ACC	AGT	CTG	CCA	GGA	GAC	AGC	GTG	ACT	CTG	ACC	TGC	CCG	GGG	GTA	183										
31	A R G V L T S L P G D S V T L T C P G V																			50											
184	GAG	CCG	GAA	GAC	AAT	GCC	ACT	GTT	CAC	TGG	GTG	CTC	AGG	AAG	CCG	GCT	GCA	GGC	TCC	CAC	243										
51	E P E D N A T V H W V L R K P A A G S H																			70											
244	CCC	AGC	AGA	TGG	GCT	GGC	ATG	GGA	AGG	AGG	CTG	CTG	CTG	AGG	TGG	GTG	CAG	CTC	CAC	GAC	303										
71	P S R W A G M G R R L L L R S V Q L H D																			90											
304	TCT	GGA	AAC	TAT	TCA	TGC	TAC	CGG	GCC	GGC	CGC	CCA	GCT	GGG	ACT	GTG	CAC	TTG	CTG	GTG	363										
91	S G N Y S C Y R A G R A G R P A G T V H L V																			110											
364	GAT	GTT	CCC	CCC	GAG	GAG	CCC	CAG	CTC	TCC	TGC	TTC	CGG	AAG	AGC	CCC	CTC	AGC	AAT	GTT	423										
111	D V P P E E P Q L S C F R K S P L S N V																			130											
424	GTT	TGT	GAG	TGG	GGT	CCT	CGG	AGC	ACC	CCA	TCC	CTG	ACG	ACA	AAG	GCT	GTG	CTC	TTG	GTG	483										
131	V C E W G P R S T P S L T T K A V L L V																			150											
484	AGG	AAG	TTT	CAG	AAC	AGT	CCG	GCC	GAA	GAC	TTT	CAG	GAG	CCG	TGC	CAG	TAT	TCC	CAG	GAG	543										
151	R K F Q N S P A E D F Q E P C Q Y S Q E																			170											
544	TCC	CAG	AAG	TTT	TCC	TGC	CAG	TTA	GCA	GTC	CCG	GAG	GGA	GAC	AGC	TCT	TTC	TAC	ATA	GTG	603										
171	S Q K F S C Q L A V P E G D S S F Y I V																			190											
604	TCC	ATG	TGC	GTC	GCC	AGT	AGT	GTC	GGG	AGC	AAG	TTT	AGC	AAA	ACT	CAA	ACC	TTT	CAG	GGT	663										
191	S M C V A S S V G S K F S K T Q T F Q G																			210											
664	TGT	GGA	ATC	TTG	CAG	CCT	GAT	CCG	CCT	GCC	AAC	ATC	ACA	GTC	ACT	GCC	GTG	GCC	AGA	AAC	723										
211	C G I L Q P D P P A N I T V T A V A R N																			230											
724	CCC	CGC	TGG	CTC	AGT	GTC	ACC	TGG	CAA	GAC	CCC	CAC	TCC	TGG	AAC	TCA	TCT	TTC	TAC	AGA	783										
231	P R W L S V T W Q D P H S W N S S F Y R																			250											
784	CTA	CGG	TTT	GAG	CTC	AGA	TAT	CGG	GCT	GAA	CGG	TCA	AAG	ACA	TTC	ACA	ACA	TGG	ATG	GTC	843										
251	L R F E L R Y R A E R S K T F T T W M V																			270											

844	AAG	GAC	CTC	CAG	CAT	CAC	TGT	GTC	ATC	CAC	GAC	GCC	TGG	AGC	GGC	CTG	AGG	CAC	GTG	GTG	903
271	K	D	L	Q	H	H	C	V	I	H	D	A	W	S	G	L	R	H	V	V	290
904	CAG	CTT	CGT	GCC	CAG	GAG	GAG	TTC	GGG	CAA	GGC	GAG	TGG	AGC	GAG	TGG	AGC	CCG	GAG	GCC	963
291	Q	L	R	A	Q	E	E	F	G	Q	G	E	W	S	E	W	S	P	E	A	310
964	ATG	GGC	ACG	CCT	TGG	ACA	GAA	TCC	AGG	AGT	CCT	CCA	GCT	CGA	GGG	GGT	GGG	GGT	TCT	GGA	1023
311	M	G	T	P	W	T	E	S	R	S	P	P	A	R	G	G	G	G	S	G	330
1024	GGT	GGA	GGT	TCT	GGA	GGT	GGA	GGT	TCT	GTC	GAG	CCA	GTA	CCC	CCA	GGG	GAA	GAT	TCC	AAA	1083
331	G	G	G	S	G	G	G	G	S	V	E	P	V	P	P	G	E	D	S	K	350
1084	GAT	GTA	GCC	GCC	CCA	CAC	AGA	CAG	CCA	CTC	ACC	TCT	TCA	GAA	CGA	ATT	GAC	AAA	CAA	ATT	1143
351	D	V	A	A	P	H	R	Q	P	L	T	S	S	E	R	I	D	K	Q	I	370
1144	CGG	TAC	ATC	CTC	GAC	GGC	ATC	TCA	GCC	CTG	AGA	AAG	GAG	ACA	TGT	AAC	AAG	AGT	AAC	ATG	1203
371	R	Y	I	L	D	G	I	S	A	L	R	K	E	T	C	N	K	S	N	M	390
1204	TGT	GAA	AGC	AGC	AAA	GAG	GCA	CTG	GCA	GAA	AAC	CTG	AAC	CTT	CCA	AAG	ATG	GCT	GAA	1263	
391	C	E	S	S	K	E	A	L	A	E	N	L	N	L	P	K	M	A	E	410	
1264	AAA	GAT	GGA	TGC	TTC	CAA	TCT	GGA	TTC	AAT	GAG	GAG	ACT	TGC	CTG	GTG	AAA	ATC	ATC	ACT	1323
411	K	D	G	C	F	Q	S	G	F	N	E	E	T	C	L	V	K	I	I	T	430
1324	GGT	CTT	TTG	GAG	TTT	GAG	GTA	TAC	CTA	GAG	TAC	CTC	CAG	AAC	AGA	TTT	GAG	AGT	AGT	GAG	1383
431	G	L	L	E	F	E	V	Y	L	E	Y	L	Q	N	R	F	E	S	S	E	450
1384	GAA	CAA	GCC	AGA	GCT	GTG	CAG	ATG	AGT	ACA	AAA	GTC	CTG	ATC	CAG	TTC	CTG	CAG	AAA	AAG	1443
451	E	Q	A	R	A	V	Q	M	S	T	K	V	L	I	Q	F	L	Q	K	K	470
1444	GCA	AAG	AAT	CTA	GAT	GCA	ATA	ACC	ACC	CCT	GAC	CCA	ACC	ACA	AAT	GCC	AGC	CTG	CTG	ACG	1503
471	A	K	N	L	D	A	I	T	T	P	D	P	T	T	N	A	S	L	L	T	490
1504	AAG	CTG	CAG	GCA	CAG	AAC	CAG	TGG	CTG	CAG	GAC	ATG	ACA	ACT	CAT	CTC	ATT	CTG	CGC	AGC	1563
491	K	L	Q	A	Q	N	Q	W	L	Q	D	M	T	T	H	L	I	L	R	S	510
1564	TTT	AAG	GAG	TTC	CTG	CAG	TCC	AGC	CTG	AGG	GCT	CTT	CGG	CAA	ATG	TAG	CATGGG	CACCTCGAC	1627		
511	F	K	E	F	L	Q	S	S	L	R	A	L	R	Q	M	*					525

Fig. 2

1	GTCGACGC	ATG	GAG	TGG	TAG	CCGAGGAGGAGC	ATG	CTG	GCC	GTC	GGC	TGC	GCG	CTG	CTG	GCT	63
1																	10
64	GCC	CTG	CTG	GCC	GCG	GGA	GCG	CTG	GCC	CCA	AGG	CGC	TGC	CCT	GCG	CAG	GTG
11	A	L	L	A	A	P	G	A	A	L	A	P	R	C	P	A	Q
																	30
124	GCA	AGA	GGC	GTG	CTG	ACC	AGT	CTG	CCA	GGA	GAC	AGC	GTG	ACT	CTG	ACC	TGC
31	A	R	G	V	L	T	S	L	P	G	D	S	V	T	L	T	C
																	50
184	GAG	CCG	GAA	GAC	AAT	GCC	ACT	GTT	CAC	TGG	GTG	CTC	AGG	AAG	CCG	GCT	GCA
51	E	P	E	D	N	A	T	V	H	W	V	L	R	K	P	A	A
																	70
244	CCC	AGC	AGA	TGG	GCT	GGC	ATG	GGA	AGG	AGG	CTG	CTG	CTG	AGG	TGC	GTG	CAG
71	P	S	R	W	A	G	M	G	R	R	L	L	L	R	S	V	Q
																	90
304	TCT	GGA	AAC	TAT	TCA	TGC	TAC	CGG	GCC	GGC	CGC	CCA	GCT	GGG	ACT	GTG	CAC
91	S	G	N	Y	S	C	Y	R	A	G	R	P	A	G	T	V	H
																	110
364	GAT	GTT	CCC	CCC	GAG	GAG	CCC	CAG	CTC	TCC	TGC	TTC	CGG	AAG	AGC	CCC	CTC
111	D	V	P	P	E	P	E	P	Q	L	S	C	F	R	K	S	P
																	130
424	GTT	TGT	GAG	TGG	GGT	CCT	CGG	AGC	ACC	CCA	TCC	CTG	ACG	ACA	AAG	GCT	GTG
131	V	C	E	W	G	P	R	S	T	P	S	L	T	T	K	A	V
																	150
484	AGG	AAG	TTT	CAG	AAC	AGT	CCG	GCC	GAA	GAC	TTT	CAG	GAG	CCG	TGC	CAG	TAT
151	R	K	F	Q	N	S	P	A	E	D	F	Q	E	P	C	Q	Y
																	170
544	TCC	CAG	AAG	TTT	TCC	TGC	CAG	TTA	GCA	GTC	CCG	GAG	GGA	GAC	AGC	TCT	TTC
171	S	Q	K	F	S	C	Q	L	A	V	P	E	G	D	S	S	F
																	190
604	TCC	ATG	TGC	GTC	GCC	AGT	AGT	GTC	GGG	AGC	AAG	TTC	AGC	AAA	ACT	CAA	ACC
191	S	M	C	V	A	S	S	V	G	S	K	F	S	K	T	Q	T
																	210
664	TGT	GGA	ATC	TTG	CAG	CCT	GAT	CCG	CCT	GCC	AAC	ATC	ACA	GTC	ACT	GCC	GTG
211	C	G	I	L	Q	P	D	P	P	A	N	I	T	V	T	A	V
																	230
724	CCC	CGC	TGG	CTC	AGT	GTC	ACC	TGG	CAA	GAC	CCC	CAC	TCC	TGG	AAC	TCA	TCT
231	P	R	W	L	S	V	T	W	Q	D	P	H	S	W	N	S	S
																	250
784	CTA	CGG	TTT	GAG	CTC	AGA	TAT	CGG	GCT	GAA	CGG	TCA	AAG	ACA	TTC	ACA	TGG
251	L	R	F	E	L	R	Y	R	A	E	R	S	K	T	F	T	T
																	270

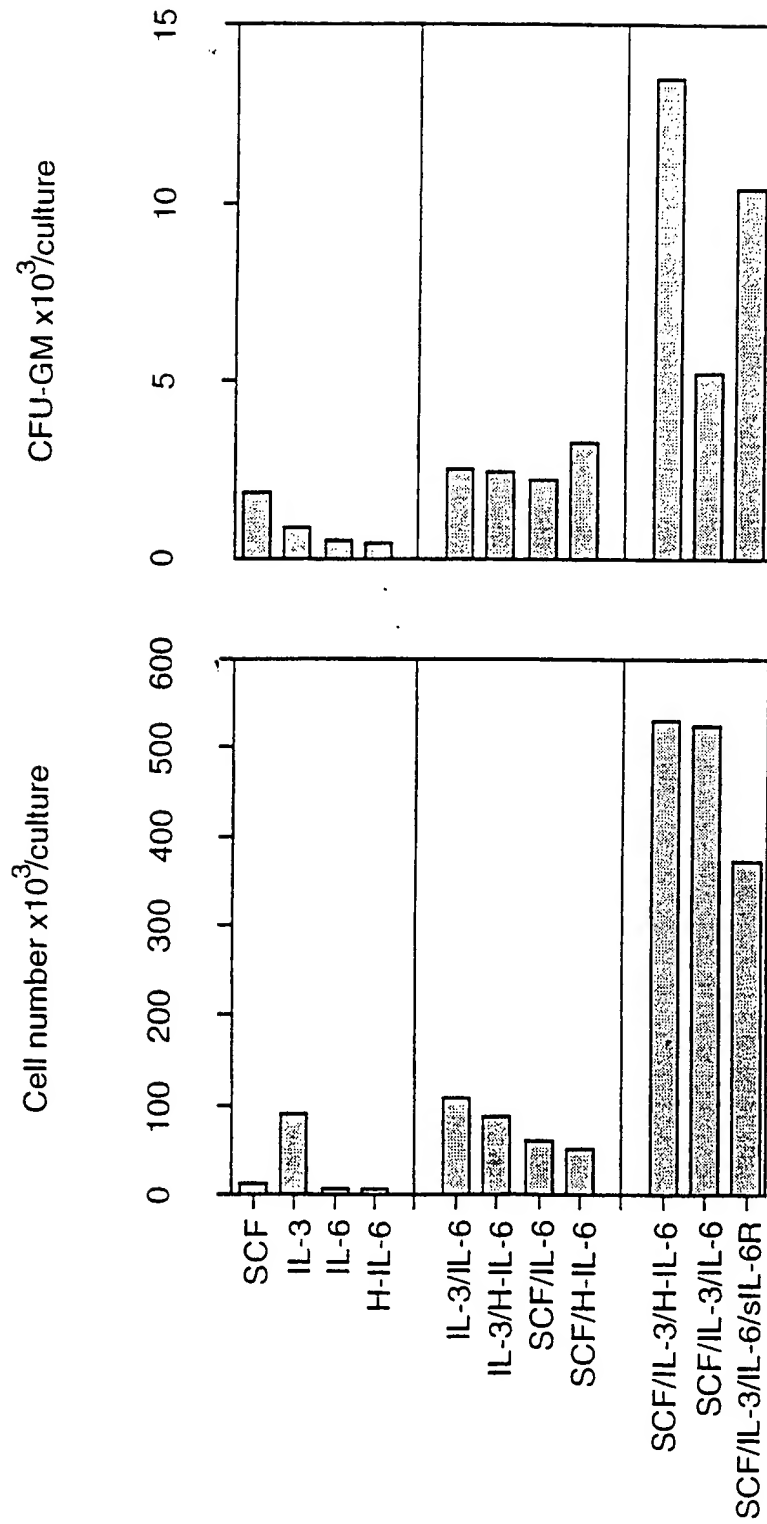
Fortsetzung Fig. 2

904 CAG CTT CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC GAG TGG AGC CCG GAG GCC 963
 291 Q L R A Q E E F G Q G E W S P E A 310
 964 ATG GGC ACG CCT TGG ACA GAA TCC AGG AGT CCT CCA GCT CGA GGA GGT GGA GGT TCT GGA 1023
 311 M G T P W T E S R S P P A R G G G G S G 330
 1024 GGT GGA GGT TCT GTC GAG CCA GTA CCC CCA GGA GAA GAT TCC AAA GAT GTA GCC GCC CCA 1083
 331 G G S V E P V P P P G E D S K D V A A P 350
 1084 CAC AGA CAG CCA CTC ACC TCT TCA GAA CGA ATT GAC AAA CAA ATT CGG TAC ATC CTC GAC 1143
 351 H R Q P L T S S E R I D K Q I R Y I L D 370
 1144 GGC ATC TCA GCC CTG AGA AAG GAG ACA TGT AAC AAG AGT AAC ATG TGT GAA AGC AGC AAA 1203
 371 G I S A L R K E T C N K S N M C E S S K 390
 1204 GAG GCA CTG GCA GAA AAC AAC CTG AAC CTG AAC ATG GCT GAA AAA GAT GGA TGC TTC 1263
 391 E A L A E N N L N L P K M A E K D G C F 410
 1264 CAA TCT GGA TTC AAT GAG GAG ACT TGC CTG GTG AAA ATC ATC ACT GGT CTT TTG GAG TTT 1323
 411 Q S G F N E E T C L V K I T G L L E F 430
 1324 GAG GTA TAC CTA GAG TAC CTC CAG AAC AGA TTT GAG AGT AGT GAG GAA CAA GCC AGA GCT 1383
 431 E V Y L E Y L Q N R F E S S E Q A R A 450
 1384 GTG CAG ATG AGT ACA AAA GTC CTG ATC CAG TTC CTG CAG AAA AAG GCA AAG AAT CTA GAT 1443
 451 V Q M S T K V L I Q F L Q K A K N L D 470
 1444 GCA ATA ACC CCT GAC CCA ACC ACA AAT GCC AGC CTG CTG AAG CTG CAG GCA CAG 1503
 471 A I T T P D P T T N A S L L T K L Q A Q 490
 1504 AAC CAG TGG CTG CAG GAC ATG ACA ACT CAT CTC ATT CTG CGC AGC TTT AAG GAG TTC CTG 1563
 491 N Q W L Q D M T T H L I L R S F K E F L 510
 1564 CAG TCC AGC CTG AGG GCT CTT CGG CAA ATG TAG C ATG GGC ACC GTC GAC 1612
 511 Q S S L R A L R Q M * 520

Fig. 3

Met	Asn	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	Ala	Phe	Gly	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Leu
Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Pro	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Pro	Pro
Gly	Glu	Asp	Ser	Lys	Asp	Val	Ala	Ala	Pro	His	Arg	Gln	Pro	Leu	Thr
5					10					15					20
Ser	Ser	Glu	Arg	Ile	Asp	Lys	Gln	Ile	Arg	Tyr	Ile	Leu	Asp	Gly	Ile
				25					30					35	
Ser	Ala	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Cys	Asn	Lys	Ser	Asn	Met	Cys	Glu	Ser
			40					45					50		
Ser	Pro	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Met	Ala
		55					60					65			
Glu	Lys	Asp	Gly	Cys	Phe	Gln	Ser	Gly	Phe	Asn	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu
	70					75					80				
Val	Lys	Ile	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	Val	Tyr	Leu	Glu	Tyr
85					90					95					100
Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	Val	Gln
				105					110					115	
Met	Ser	Thr	Lys	Val	Leu	Ile	Gln	Phe	Leu	Gln	Lys	Lys	Ala	Lys	Asn
			120					125					130		
Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu
		135					140					145			
Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Glu	Asp	Met	Pro	Thr	His
	150					155					160				
Leu	Ile	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Leu	Arg	Ala
165					170					175					180
Leu	Arg	Gln	Met												
			184												

Fig. 4



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/24, 15/12 C07K 14/54, 14/715, 14/71, A61K 47/48, 38/17		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/32891 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. September 1997 (12.09.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00458 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. März 1997 (07.03.97) (30) Prioritätsdaten: 196 08 813.5 7. März 1996 (07.03.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ANGE- WANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH [DE/DE]; Rischerstrasse 12, D-69123 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ROSE-JOHN, Stefan [DE/DE]; I. Medizinische Klinik - Abt. Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Obere Zahlbacherstrasse 63, D-55101 Mainz (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger- Strasse 246, D-81825 München (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 5. Februar 1998 (05.02.98)
(54) Title: CONJUGATE FOR MODIFYING INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS (54) Bezeichnung: KONJUGAT ZUR BEEINFLUSSUNG VON WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PROTEINEN (57) Abstract <p>The present invention concerns a conjugate comprising two polypeptides with a mutual affinity and connected via a linker. It also concerns the use of such a conjugate to modify interactions between proteins.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Konjugats zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 97/00458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/62 C07K19/00 C12N15/24 C12N15/12 C07K14/54
C07K14/715 C07K14/71 A61K47/48 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STOYAN T. ET AL.: "Recombinant soluble human interleukin-6 receptor" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 216, no. 1, 11 August 1993, pages 239-245, XP002047601	1-6,9
Y	see page 241, column 1, paragraph 4	10-15
X	EHRLERS M ET AL: "IDENTIFICATION OF TWO NOVEL REGIONS OF HUMAN IL-6 RESPONSIBLE FOR RECEPTOR BINDING AND SIGNAL TRANSDUCTION" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 153, no. 4, 15 August 1994, pages 1744-1753, XP000565715	1-6,9,15
Y	see page 1, column 2, paragraph 2	10-14

-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 November 1997

Date of mailing of the international search report

15-12-1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040 Telex 31 651 epp nl

Authorized officer

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 04314 A (DADE INT INC ;WONG HING C (US); RHODE PETER R (US); WEIDANZ JON A) 15 February 1996	1-4,8-15
Y	see the whole document	1-7, 10-15

X	US 5 260 203 A (LADNER ROBERT C ET AL) 9 November 1993	1
Y	see the whole document	1-7, 10-15

X	WO 95 15341 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;CHESTER KERRY ANNE (GB); HAWKINS ROBERT) 8 June 1995	1
Y	see figures 1,11	1-7, 10-15

Y	SUI, X. ET AL.: "gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 92, March 1995, WASHINGTON US, pages 2859-2863, XP002047602 see the whole document	1-6, 10-15

P,X	FISCHER, M. ET AL.: "A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion" NATURE BIOTECHNOLOGY., vol. 15, no. 2, February 1997, UBLISHING US, pages 142-145, XP002047603 see the whole document	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE97/00458

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplementary sheet additional information PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Note:

Inasmuch the claim 15 refers to a treatment method to be applied to human / animal bodies, the research was made based on the quoted effects of the bond/compound

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/00458

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9604314 A	15-02-96	AU 3403995 A	04-03-96
		CA 2196085 A	15-02-96
		EP 0776339 A	04-06-97

US 5260203 A	09-11-93	US 4946778 A	07-08-90
		US 5455030 A	03-10-95
		US 5518889 A	21-05-96
		US 5534621 A	09-07-96
		JP 2000197 A	05-01-90
		DE 3785186 A	06-05-93
		DK 368588 A	01-07-88
		EP 0281604 A	14-09-88
		WO 8801649 A	10-03-88

WO 9515341 A	08-06-95	AU 1194795 A	19-06-95
		CA 2177584 A	08-06-95
		EP 0733072 A	25-09-96
		JP 9505737 T	10-06-97
		NZ 277057 A	27-07-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: ales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00458

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/62 C07K19/00 C12N15/24 C12N15/12 C07K14/54
C07K14/715 C07K14/71 A61K47/48 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STOYAN T. ET AL.: "Recombinant soluble human interleukin-6 receptor" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 216, Nr. 1, 11. August 1993, Seiten 239-245, XP002047601	1-6,9
Y	siehe Seite 241, Spalte 1, Absatz 4	10-15
X	EHRLERS M ET AL: "IDENTIFICATION OF TWO NOVEL REGIONS OF HUMAN IL-6 RESPONSIBLE FOR RECEPTOR BINDING AND SIGNAL TRANSDUCTION" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 153, Nr. 4, 15. August 1994, Seiten 1744-1753, XP000565715	1-6,9,15
Y	siehe Seite 1, Spalte 2, Absatz 2	10-14

	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. November 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

7 5 -12- 1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (31) 78 640 2040, Telex 31 651 2000

Bevollmächtigter Bediensteter

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 04314 A (DADE INT INC ;WONG HING C (US); RHODE PETER R (US); WEIDANZ JON A) 15.Februar 1996	1-4,8-15
Y	siehe das ganze Dokument	1-7, 10-15

X	US 5 260 203 A (LADNER ROBERT C ET AL) 9.November 1993	1
Y	siehe das ganze Dokument	1-7, 10-15

X	WO 95 15341 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;CHESTER KERRY ANNE (GB); HAWKINS ROBERT) 8.Juni 1995	1
Y	siehe Abbildungen 1,11	1-7, 10-15

Y	SUI, X. ET AL.: "gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., Bd. 92, März 1995, WASHINGTON US, Seiten 2859-2863, XP002047602 siehe das ganze Dokument	1-6, 10-15

P,X	FISCHER, M. ET AL.: "A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion" NATURE BIOTECHNOLOGY., Bd. 15, Nr. 2, Februar 1997, PUBLISHING US, Seiten 142-145, XP002047603 siehe das ganze Dokument	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00458

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht rechtfertigbar erweisen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung :

So weit der Anspruch 15
sich auf ein Verfahren zur
Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die
Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen
der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung..., die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: 31es Aktenzeichen

PCT/DE 97/00458

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9604314 A	15-02-96	AU 3403995 A	04-03-96
		CA 2196085 A	15-02-96
		EP 0776339 A	04-06-97

US 5260203 A	09-11-93	US 4946778 A	07-08-90
		US 5455030 A	03-10-95
		US 5518889 A	21-05-96
		US 5534621 A	09-07-96
		JP 2000197 A	05-01-90
		DE 3785186 A	06-05-93
		DK 368588 A	01-07-88
		EP 0281604 A	14-09-88
		WO 8801649 A	10-03-88

WO 9515341 A	08-06-95	AU 1194795 A	19-06-95
		CA 2177584 A	08-06-95
		EP 0733072 A	25-09-96
		JP 9505737 T	10-06-97
		NZ 277057 A	27-07-97

VERTRABER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

28 Rec'd 7/11/10 08 SEP 1998
PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts A 2953	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 97/ 00458	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/03/1997	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 07/03/1996

Anmelder

ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE...et al.

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☒ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. -
 - ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
 - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erweisen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung :

So weit der Anspruch 15

sich auf ein Verfahren zur

Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die
Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen
der Verbindung/Zusammensetzung.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/62 C07K19/00 C12N15/24 C12N15/12 C07K14/54
C07K14/715 C07K14/71 A61K47/48 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STOYAN T. ET AL.: "Recombinant soluble human interleukin-6 receptor" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 216, Nr. 1, 11. August 1993, Seiten 239-245, XP002047601	1-6,9
Y	siehe Seite 241, Spalte 1, Absatz 4 ---	10-15
X	EHLERS M ET AL: "IDENTIFICATION OF TWO NOVEL REGIONS OF HUMAN IL-6 RESPONSIBLE FOR RECEPTOR BINDING AND SIGNAL TRANSDUCTION" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 153, Nr. 4, 15. August 1994, Seiten 1744-1753, XP000565715	1-6,9,15
Y	siehe Seite 1, Spalte 2, Absatz 2 ---	10-14
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. November 1997

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

15-12-1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Chambonnet, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 04314 A (DADE INT INC ;WONG HING C (US); RHODE PETER R (US); WEIDANZ JON A) 15. Februar 1996	1-4,8-15
Y	siehe das ganze Dokument	1-7, 10-15

X	US 5 260 203 A (LADNER ROBERT C ET AL) 9. November 1993	1
Y	siehe das ganze Dokument	1-7, 10-15

X	WO 95 15341 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;CHESTER KERRY ANNE (GB); HAWKINS ROBERT) 8. Juni 1995	1
Y	siehe Abbildungen 1,11	1-7, 10-15

Y	SUI, X. ET AL.: "gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., Bd. 92, März 1995, WASHINGTON US, Seiten 2859-2863, XP002047602 siehe das ganze Dokument	1-6, 10-15

P,X	FISCHER, M. ET AL.: "A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion" NATURE BIOTECHNOLOGY., Bd. 15, Nr. 2, Februar 1997, PUBLISHING US, Seiten 142-145, XP002047603 siehe das ganze Dokument	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00458

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9604314 A	15-02-96	AU 3403995 A CA 2196085 A EP 0776339 A	04-03-96 15-02-96 04-06-97
US 5260203 A	09-11-93	US 4946778 A US 5455030 A US 5518889 A US 5534621 A JP 2000197 A DE 3785186 A DK 368588 A EP 0281604 A WO 8801649 A	07-08-90 03-10-95 21-05-96 09-07-96 05-01-90 06-05-93 01-07-88 14-09-88 10-03-88
WO 9515341 A	08-06-95	AU 1194795 A CA 2177584 A EP 0733072 A JP 9505737 T NZ 277057 A	19-06-95 08-06-95 25-09-96 10-06-97 27-07-97

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) A 2953

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Angewandte Gentechnologie
Systeme GmbH
Rischerstr. 12
69123 Heidelberg

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

ROSE-JOHN, Stefan
I. Medizinische Klinik-Abt. Pathophysiologie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung
Obere Zahlbacherstr. 63 55101 Mainz

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☐

Anwalt

☐

gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Dr. Bernard Huber

HUBER & SCHÜSSLER
Patentanwälte · Patent Attorneys
Truderinger Straße 246 · 81825 München
Tbl. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49

Telefonnr.:

089/42724748

Telefaxnr.:

089/42724749

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ **AP ARIPO-Patent:** KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |
| <input type="checkbox"/> LT Litauen | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

- ☐
- ☐
- ☐
- ☐
- ☐

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingegeben.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCHWeitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. ☐

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) Deutschland	7. März 1996	196 08 813.5	
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

☒ Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) 1 bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.**Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE****Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA)** (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA / _____

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt):

Datum (Tag/Monat/Jahr):

Aktenzeichen:

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfasst:

1. Antrag : 3 Blätter
 2. Beschreibung : 10 Blätter
 3. Ansprüche : 2 Blätter
 4. Zusammenfassung : 1 Blätter
 5. Zeichnungen : 3 Blätter
Insgesamt : 19 Blätter

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☐ Unterzeichnete gesonderte Vollmacht
 2. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht
 3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift
 4. ☐ Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):
 5. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
 6. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen
 7. ☐ Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
 8. ☒ Sonstige (einzeln auführen):
 Scheck, Text f. Priobeleg

Abbildung Nr. _____ der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Dr. Bernard Huber

7.3.1997

Patentanwalt

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA / _____	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

Anmelder: Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH
"Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen"
Unser Zeichen: A 2953 - hu / wd

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, daß sich zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen eignet, eine ein solches Konjugat kodierende DNA und die Verwendung des Konjugats.

Viele Vorgänge in einem Organismus beruhen auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen. Beispiele solcher Wechselwirkungen finden sich bei Rezeptoren und den an sie bindenden Liganden. Oftmals sind allerdings die Wechselwirkungen zwischen Proteinen gestört. Dies kann daran liegen, daß einzelne an den Wechselwirkungen beteiligte Proteine modifiziert sind, wodurch ihre Affinität zu anderen, ebenfalls beteiligten Proteinen verändert ist. Auch können einzelne an den Wechselwirkungen beteiligte Proteine fehlen. Dies findet man z.B. bei Zellen, die nicht auf Interleukin-6 (IL-6) reagieren. Solche Zellen weisen einen unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor auf, d. h. dieser Rezeptor umfaßt lediglich die intrazelluläre, Signal-auslösende Untereinheit gp130, nicht aber die extrazelluläre, IL-6 bindende Untereinheit (IL-6R).

Viele Versuche werden unternommen, gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beheben. Beispielsweise wird dies bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor durch Verabreichung von IL-6 (50 ng/ml) und löslichem IL-6R (sIL-6R) (1280 ng/ml) versucht. Die Bereitstellung von sIL-6R bedingt jedoch einen großen Kosten- und Zeitaufwand, da sIL-6R nur biologisch aktiv ist, wenn es aus eukaryotischen Zellen stammt, und die Erträge aus solchen im Bereich von 1-6 mg sIL-6R/l liegen. Die genannte Verabreichung stellt somit kein geeignetes Mittel dar, dauerhaft die gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor zu beheben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen, insbesondere bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor, behoben werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck "eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide" betrifft Polypeptide jeglicher Art, Herkunft und Länge, die eine Affinität zueinander aufweisen. Zwei solcher Polypeptide liegen in einem erfindungsgemäßen Konjugat vor. Eines dieser Polypeptide kann ein Rezeptor und das andere ein an den Rezeptor bindender Ligand sein. Der Rezeptor kann in Form seiner Untereinheit bzw. des funktionellen Teils davon vorliegen, die den Liganden binden. Ebenso kann der Ligand in Form seiner Untereinheit bzw. des funktionellen Teils davon vorliegen, die den Rezeptor binden. Vorzugsweise ist der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor, insbesondere ein Rezeptor für Lymphokine, Monokine, Interferone, "colony stimulating factors" oder Interleukine. Besonders bevorzugt ist der Rezeptor ein Interleukin-6-Rezeptor oder ein CNTF-Rezeptor. Entsprechendes gilt für den Liganden. Dieser ist vorzugsweise ein Zytokin, insbesondere ein Lymphokin, Monokin, Interferon, "colony stimulating factor" oder Interleukin. Besonders bevorzugt ist der Ligand ein Mitglied der Interleukin-6-Familie, insbesondere IL-6, IL-11, CNTF, OSM, LIF oder CT-1. Der Rezeptor und der Ligand können Wildtyp-Sequenzen oder hiervon durch ein oder mehrere Nukleotide unterschiedliche Sequenzen umfassen. Dadurch können der Rezeptor und der Ligand verbesserte und/oder neue Eigenschaften aufweisen. Verbesserte Eigenschaften können z.B. darin liegen, daß die Bindung zwischen dem Rezeptor und dem Ligand verbessert ist. Neue Eigenschaften können z.B. darin liegen, daß der Ligand ein verändertes Verhalten zu Proteinen zeigt, mit denen er nach Bindung an den Rezeptor reagiert. Beispielsweise kann IL-6 dahingehend verändert sein, daß es eine stärkere Bindung an den IL-6-Rezeptor hat, das Protein gp130 aber nicht mehr aktivieren kann. In einem solchen Fall umfaßt IL-6 vorzugsweise die Sequenz von Fig. 3 oder Fragmente davon. Vorstehende Ausführungen hinsichtlich einer Verände-

rung der Wildtyp-Sequenz eines Rezeptors bzw. eines Liganden gelten entsprechend für deren Untereinheiten und funktionellen Teile davon, die zu einer gegenseitigen Bindung beitragen.

Der Ausdruck "Linker" betrifft Linker jeglicher Art, die sich zur Verbindung von Polypeptiden eignen. Beispiele solcher Linker sind bifunktionelle, chemische Cross-Linker, z.B. DPDPB. Ferner kann der Linker eine durch die beiden Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke sein. Desweiteren kann der Linker ein Polypeptid sein.

In bevorzugter Ausführungsform ist ein vorstehendes Konjugat ein Fusionspolypeptid. In diesem können die zwei, eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide miteinander fusioniert sein und der Linker einer durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke darstellen. Vorzugsweise ist der Linker ein Polypeptid, das die zwei anderen Polypeptide miteinander verbindet. Beispiele letzteren Fusionspolypeptids sind in den Figuren 1 und 2 angegeben. Diese Fusionspolypeptide umfassen ein humanes sIL-6R-Polypeptid, d.h. die extrazelluläre Untereinheit eines Interleukin-6-Rezeptors, und ein humanes IL-6-Polypeptid, wobei die Polypeptide über unterschiedliche Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind. Diese Fusionspolypeptide werden mit H-IL-6 bezeichnet. Eine Variation von H-IL-6, die von dem sIL-6R-Polypeptid nur die Aminosäuren Pro 114 bis Ala 323 enthält, wird ebenfalls bereitgestellt. Ferner wird eine Variation von H-IL-6 bereitgestellt, welche die Aminosäuren 113 bis 323 des sIL-6R-Polypeptids und die Aminosäuren 29 bis 212 des IL-6-Polypeptids umfaßt. Desweiteren wird ein Fusionspolypeptid H-IL-6 bereitgestellt, dessen IL-6-Polypeptid die Sequenz von Fig. 3 umfaßt. Das sIL-6R-Polypeptid dieses Fusionspolypeptids umfaßt eine vollständige Sequenz bzw. die Sequenz zwischen den Aminosäuren 113 (114) bis 323 eines sIL-6R-Polypeptids. Darüberhinaus wird ein Fusionspolypeptid bereitgestellt, das die extrazelluläre Untereinheit eines humanen CNTF-Rezeptors und humanes CNTF umfaßt, wobei beide Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein vorstehendes Fusionspolypeptid kodierende DNA. Vorzugsweise kodiert die DNA für ein Fusionspolypeptid, bei dem die zwei, eine Affinität zueinander aufweisenden Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind. Ein Beispiel letzterer DNA ist in Fig. 1 angegeben. Diese DNA wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als CDM8-H-IL-6 unter DSM 10549 am 27. 2. 1996 hinterlegt.

Eine erfindungsgemäße DNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100, Ycpad1 und Vektoren für *Pichia pastoris* zu nennen, wobei letztere bevorzugt sind, während für die Expression in tierischen Zellen, die in einem Organismus oder außerhalb eines solchen vorliegen können, z.B. pKCR, pEFBOS, pCEV4 und pCDM8 angegeben sind, wobei letzterer bevorzugt ist. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A. Der Fachmann wird berücksichtigen, daß für die Expression einer erfindungsgemäßen, sIL-6R-Sequenzen enthaltenden, DNA Vektoren angeraten sind, die eine Expression in eukaryotischen Zellen ermöglichen.

Ferner kennt der Fachmann geeignete Zellen, um eine erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*, wobei letzterer bevorzugt ist, die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, Vero, HeLa und COS, wobei letztere bevorzugt sind, sowie die Insektenzellen sf9.

Desweiteren weiß der Fachmann, in welcher Weise eine erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Auch kennt er Bedingungen, Zellen zu transformieren bzw. transfizieren und diese dann zu kultivieren. Darüberhinaus sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA

exprimierte Fusionspolypeptid zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Fusionspolypeptid gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden Fusionspolypeptid zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen Fusionspolypeptid erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beeinflussen. Dies kann durch die Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate wie auch durch den Einsatz erfindungsgemäßer DNA in einer Gentherapie erfolgen. Insbesondere können die gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor behoben werden. Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß sie kostengünstig eingesetzt werden kann. Dies zeigt sich insbesondere in der Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate zur Beeinflussung der gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor.

Ferner eignet sich die vorliegende Erfindung zur ex vivo Expansion von Stammzellen, insbesondere humanen Stammzellen. Besonders bemerkenswert ist es dabei, daß mit einem erfindungsgemäßen Konjugat H-IL-6 mehr Stammzell-Kolonien im Soft-Agar erhalten werden, als dies mit den einzelnen Komponenten IL-6 und sIL-6R möglich ist. Die vorliegende Erfindung stellt somit auch einen wichtigen Beitrag dar, gezielt in die Bildung von Blutzellen einzugreifen.

Desweiteren stellt die vorliegende Erfindung mit einem Fusionspolypeptid H-IL-6, das als IL-6-Polypeptid die Sequenz von Fig. 3 umfaßt, ein Mittel bereit, das sich

als IL-6-Rezeptor-Antagonist eignet. Ein solches Mittel ist von hohem therapeutischen Wert.

Die Durchführung der vorliegenden Erfindung kann durch die erfindungsgemäßen Antikörper überwacht werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

- Fig. 1 zeigt die Aminosäure (DNA)-sequenz eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6. Sequenzen für das Restriktionsenzym Sall (GTCGAC), das Signalpeptid (MLAVGCALLAALLAAPGAA) und den Linker (RGGGGSGGGGSGGGGSVE) sind angegeben. Der Linker verbindet den COOH-Terminus von humanem sIL-6R mit dem NH₂-Terminus von humanem IL-6.
- Fig. 2 zeigt die Aminosäure (DNA)-sequenz eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6. Sequenzen für das Restriktionsenzym Sall (GTCGAC), das Signalpeptid (MLAVGCALLAALLAAPGAA) und den Linker (RGGGGSGGGGSGGGGSVE) sind angegeben. Der Linker verbindet den COOH-Terminus von humanem sIL-6R mit dem NH₂-Terminus von humanem IL-6.
- Fig. 3 zeigt die Aminosäuresequenz des in einem erfindungsgemäßen Fusionspolypeptid H-IL-6 vorliegenden IL-6-Polypeptids.
- Fig. 4 zeigt die Expansions- und Koloniebildungsfähigkeit eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung einer erfindungsgemäßen DNA

Es wurde die DNA von Fig. 1 hergestellt. Dazu wurde humane IL-6R cDNA (Schooltink et al., Biochem. J. (1991) 277, 659-664) verwendet. Diese cDNA wurde in das Expressionsplasmid pCDM8 über die Restriktionsstelle Xho I einkloniert (Müllberg et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 473-480). Mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde unter Verwendung der Primer (1) (pCDM8 5' Primer: 5' TAATACGACTCACTATAGGG3') und Primer (2) (sIL-6R 3' Primer: 5' CCGCTCGAGCTGGAGGACTCCTGGA 3') bei Standardbedingungen ein sIL-6R Fragment generiert, das nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xho I in das geöffnete Plasmid pCDM8 einkloniert wurde. Es entstand das Plasmid pCDM8-sIL-6R. Anschließend wurde eine zweite PCR Reaktion mit IL-6 cDNA, die ebenfalls in das Expressionsplasmid pCDM8 unter Verwendung von Xho I einkloniert worden war, durchgeführt. Es wurden die Primer (3) (IL-6-5' Primer: 5' CGGCTCGAGCCAGTACCCCCAGGAGAA3') und Primer (4) (pCDM8 3' Primer: 5' CCACAGAAGTAAGGTTCTT3') verwendet. Das PCR Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Xho I und Not I geschnitten und in das Plasmid pCDM8-sIL-6R einkloniert. Es entstand das Plasmid pCDM8-sIL-6R-IL-6. Anschließend wurde ein synthetischer Linker hergestellt, der aus zwei Oligonukleotiden bestand: Primer (5) (5' TCGAGGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTGG3') und Primer (6) (5' TCGACAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCC3'). Die Oligonukleotide (5) und (6) wurden nach Standardmethoden zu einem Doppelstrang zusammengefügt und anschließend in das mit dem Restriktionsenzym Xho I verdaute Plasmid pCDM8-sIL-6R-IL-6 einkloniert. Es entstand das Plasmid pCDM8-H-IL-6.

Beispiel 2: Herstellung einer erfindungsgemäßen DNA

Es wurde die DNA von Fig. 2 hergestellt. Hierzu wurde vorgegangen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Als Primer (5) und (6) wurden jedoch verwendet: Primer (5) (5' TCGAGGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTGG3') und Primer (6)

(5'TCGACAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCC3'. Es wurde das Plasmid pCDM8-H-IL-6-(2) erhalten.

Beispiel 3: Expression eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids

5

10

COS-7-Zellen wurden mit pCDM8-H-IL-6 von Beispiel 1 bzw. pCDM8-H-IL-6(2) von Beispiel 2 mit Hilfe der Elektroporation transfiziert. Es wurden 10^7 COS-7 Zellen mit $20\mu\text{g}$ Plasmid mit Hilfe eines Gene-Pulsers (Bio-Rad) bei $960\mu\text{F}$ und 230 V elektroporiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen metabolisch mit [^{35}S]-Cystein/Methionin 4 h radioaktiv markiert und 2 h mit nicht radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert. Der Überstand aus Zellysat und Zellüberstand wurde nach Standardmethoden (Müllberg et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 473-480) mit einem anti-IL-6 Antikörper immunpräzipitiert und nach SDS-Gelelektrophorese durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Transfizierte COS-7 Zellen sezernierten ein 70-75 kDa Protein, das von einem anti-IL-6 Antikörper erkannt und nicht von untransfizierten Zellen gebildet wurde.

20

Überstände von transfizierten COS-7 Zellen wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem anti-IL-6 Antikörper detektiert. Wiederum exprimierten transfizierte COS-7 Zellen ein 70-75 kDa Protein, das von einem anti-IL-6 Antikörper erkannt wurde.

25

Überstände von transfizierten COS-7 Zellen wurden mit Hilfe eines kommerziellen ELISA auf IL-6 (CLB, Amsterdam) und sIL-6R (Seromed, Gießen) untersucht. Mit beiden ELISAs wurde H-IL-6 detektiert. Die Konzentration von H-IL-6 im Zellüberstand betrug etwa $1\mu\text{g/ml}$.

Beispiel 4: Stimulation der Haptoglobin-Expression durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid

30

Es wurden die humanen Hepatomazelllinien HepG2, HepG2-IL-6 und HepG2-PDI verwendet.

HepG2 Zellen (ATCC HB 8065) werden durch IL-6, nicht aber durch sIL-6R stimuliert, Haptoglobin zu exprimieren.

5 HepG2-IL-6 Zellen wurden durch stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem humanen IL-6-Expressionsplasmid erhalten. Diese Zellen regulieren aufgrund der IL-6 Expression endogenes IL-6R herunter und exprimieren somit kein IL-6R. HepG2-IL-6 Zellen werden nicht durch IL-6, aber durch sIL-6R stimuliert, Haptoglobin zu exprimieren.

10 HepG2-PDI Zellen wurden durch stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem humanen IL-6-Expressionsplasmid erhalten. Hierzu wies das Expressionsplasmid eine IL-6 cDNA auf, durch die das exprimierte IL-6 Protein ein COOH-terminales Retentionssignal für das Endoplasmatische Retikulum (ER) enthielt. Daraus resultierte, daß diese Zellen nicht durch das exprimierte IL-6, sondern
15 auch IL-6R im ER zurückhielten. Im Gegensatz zu HepG2-IL-6 Zellen sezernieren aber HepG2-PDI Zellen kein IL-6 und können nur durch die Kombination von IL-6 und sIL-6R stimuliert werden, Haptoglobin zu exprimieren.

20 Die vorstehenden Hepatomazelllinien wurden nach Standardbedingungen in 96er Zellkulturplatten kultiviert (Rose-John et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 22084-22091). Die Zellen wurden mit IL-6, sIL-6R, IL-6 + sIL-6R bzw. Zellüberständen aus mit pCDM8-H-IL-6, pCDM8-H-IL-6(2) bzw. pCDM8 transfizierten COS-7 Zellen von Beispiel 3 18 h stimuliert. Der Zellüberstand wurde geerntet und die Haptoglobinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt (vgl. Tabelle I).

25

30

Tabelle I

Stimulation der Haptoglobin-Expression

5		IL-6	sIL-6R	IL-6 + sIL-6R	H-IL-6	Kontrolle
	HepG2	+	-	++	+++	-
	HepG2-IL-6	-	++	++	+++	-
	HepG2-PDI	-	-	++	+++	-

10 Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid, H-IL-6, in der Lage ist, die Expression von Haptoglobin in Zellen zu stimulieren, d.h. die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beeinflussen.

15 **Beispiel 5: Expansion und Koloniebildung von humanen CD34⁺-Zellen durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid**

20 Aus humanem Knochenmark bzw. aus Blut von Patienten, deren Stammzellen durch Injektion von G-CSF mobilisiert worden waren, wurden Zellen isoliert, die den Oberflächenmarker CD34 exprimieren. 6000 dieser Zellen wurden in 3ml Medium in Zellkulturgefäße platiert. Nach zwei Wochen zeigte es sich, daß eine Inkubation der Zellen mit den Zytokinen SCF, IL-3 und H-IL-6 (erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid), wie auch mit SCF, IL-3 und IL-6 eine starke Proliferation verursachte. Von den entstandenen Zellen wurden 1000 Zellen in neue Zellkulturgefäße platiert. Nach zwei Wochen in einem standardisierten Kolonie-

25 Induktions-Versuch waren die mit SCF, IL-3 und H-IL-6 behandelten Zellen in der Lage, etwa dreimal mehr Kolonien zu bilden als mit SCF, IL-3 und IL-6 behandelte Zellen.

30 Dieses Ergebnis zeigt, daß Zellen, die durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid H-IL-6 stimuliert wurden, ein höheres koloniebildendes Potential besitzen als durch IL-6 stimulierte Zellen (vgl. Fig. 4).

Patentansprüche

1. Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind.
- 5 2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das eine Polypeptid ein Rezeptor und das andere ein den Rezeptor bindender Ligand ist.
3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor in Form seiner den Liganden bindenden Untereinheit vorliegt.
- 10 4. Konjugat nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand in Form seiner den Rezeptor bindenden Untereinheit vorliegt.
5. Konjugat nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor und der Ligand ein Zytokin ist.
- 15 6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein IL-6 Rezeptor und das Zytokin ein IL-6 ist.
- 20 7. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein CNTF-Rezeptor und das Zytokin ein CNTF ist.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke ist.
- 25 9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein bifunktioneller, chemischer Cross-Linker ist.
- 30 10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat ein Fusionspolypeptid ist.

- 12 -

11. Konjugat nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein Polypeptid ist, das die zwei anderen Polypeptide miteinander verbindet.

12. DNA, kodierend für das Konjugat nach Anspruch 10 oder 11.

5

13. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 12.

14. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 13.

10

15. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 - 11 und der DNA nach Anspruch 12 zur Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

Zusammenfassung

Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Konjugats zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Protei-

10

nen.

1	GTG GAC GCAT GGA GTG GTAG CCG AGG AGG AAG C	ATG CTG GCC GTC GGC TGC GCG CTG CTG GCT	63
1	M L A V G C A L L A		10
64	GCC CTG CTG GCC GCG CCG GGA GCG GCG CTG GCC CCA AGG CCG TGC CCT GCG CAG GAG GTG		123
11	A L L A A P G A A L		30
124	GCA AGA GGC GTG CTG ACC AGT CTG CCA GGA GAC AGC GTG ACT CTG ACC TGC CCG GGG GTA		183
31	A R G V L T S L P G D S V T L T C P G V		50
184	GAG CCG GAA GAC AAT GCC ACT GTT CAC TGG GTG CTC AGG AAG CCG GCT GCA GGC TCC CAC		243
51	E P E D N A T V H W V L R K P A A G S H		70
244	CCC AGC AGA TGG GCT GGC ATG GGA AGG AGG CTG CTG CTG AGG TCG GTG CAG CTC CAC GAC		303
71	P S R W A G M G R R L L L R S V Q L H D		90
304	TCT GGA AAC TAT TCA TGC TAC CGG GCC GGC CCG CCA GCT GGG ACT GTG CAC TTG CTG GTG		363
91	S G N Y S C Y R A G R P A G T V H L L V		110
364	GAT GTT CCC CCC GAG GAG CCC CAG CTC TCC TGC TTC CGG AAG AGC CCC CTC AGC AAT GTT		423
111	D V P P E E P Q L S C F R K S P L S N V		130
424	GTT TGT GAG TGG GGT CCT CGG AGC ACC CCA TCC CTG ACG ACA AAG GCT GTG CTC TTG GTG		483
131	V C E W G P R S T P S L T T K A V L L V		150
484	AGG AAG TTT CAG AAC AGT CCG GCC GAA GAC TTC CAG GAG CCG TGC CAG TAT TCC CAG GAG		543
151	R K F Q N S P A E D F Q E P C Q Y S Q E		170
544	TCC CAG AAG TTC TCC TGC CAG TTA GCA GTC CCG GAG GGA GAC AGC TCT TTC TAC ATA GTG		603
171	S Q K F S C Q L A V P E G D S S F Y I V		190
604	TCC ATG TGC GTC GCC AGT AGT GTC GGG AGC AAG TTC AGC AAA ACT CAA ACC TTT CAG GGT		663
191	S M C V A S S V G S K F S K T Q T F Q G		210
664	TGT GGA ATC TTG CAG CCT GAT CCG CCT GCC AAC ATC ACA GTC ACT GCC GTG GCC AGA AAC		723
211	C G I L Q P D P P A N I T V T A V A R N		230
724	CCC CGC TGG CTC AGT GTC ACC TGG CAA GAC CCC CAC TCC TGG AAC TCA TCT TTC TAC AGA		783
231	P R W L S V T W Q D P H S W N S S F Y R		250
784	CTA CGG TTT GAG CTC AGA TAT CGG GCT GAA CGG TCA AAG ACA TTC ACA ACA TGG ATG GTC		843
251	L R F E L R Y R A E R S K T F T T W M V		270
844	AAG GAC CTC CAG CAT CAC TGT GTC ATC CAC GAC GCC TGG AGC GGC CTG AGG CAC GTG GTG		903
271	K H D L Q H H C V I H D A W S G L R H V V		290
904	CAG CTT CGT GCC GAG GAG GAT TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC GAG TGG AGC CCG GAG GCC		963
291	Q L R A Q E E F G G Q G E W S E W S P E A		310
964	ATG GGC ACG CCT TGG ACA GAA TCC AGG AGT CCT CCA GCT CGA GGA GGT GGA GGT TCT GGA		1023
311	M G T P W T E S R S P P A R G G G G S G		330
1024	GGT GGA GGT TCT GGA GGT GGA GGT TCT GTC GAG CCA GTA CCC CCA GGA GAA GAT TCC AAA		1083
331	G G G S G G G S V E P V P P G E D S K		350
1084	GAT GTA GCC GCC CCA CAC AGA CAG CCA CTC ACC TCT TCA GAA CGA ATT GAC AAA CAA ATT		1143
351	D V A A P H R Q P L T S S E R I D K Q I		370
1144	CGG TAC ATC CTC GAC GGC ATC TCA GCC CTG AGA AAG GAG ACA TGT AAC AAG AGT AAC ATG		1203
371	R Y I L D G I S A L R K E T C N K S N M		390
1204	TGT GAA AGC AGC AAA GAG GCA CTG GCA GAA AAC AAC CTG AAC CTT CCA AAG ATG GCT GAA		1263
391	C E S S K E A L A E N N L N L P K M A E		410
1264	AAA GAT GGA TGC TTC CAA TCT GGA TTC AAT GAG GAG ACT TGC CTG GTG AAA ATC ATC ACT		1323
411	K D G C F Q S G F N E E T C L V K I I T		430
1324	GGT CTT TTG GAG TTT GAG GTA TAC CTA GAG TAC CTC CAG AAC AGA TTT GAG AGT AGT GAG		1383
431	G L L E F E V Y L E Y L Q N R F E S S E		450
1384	GAA CAA GCC AGA GCT GTG CAG ATG AGT ACA AAA GTC CTG ATC CAG TTC CTG CAG AAA AAG		1443
451	E Q A R A V Q M S T K V L I Q F L Q K K		470
1444	GCA AAG AAT CTA GAT GCA ATA ACC ACC CCT GAC CCA ACC ACA AAT GCC AGC CTG CTG ACG		1503
471	A K N L D A I T T P D P T T N A S L L T		490
1504	AAG CTG CAG GCA CAG AAC CAG TGG CTG CAG GAC ATG ACA ACT CAT CTC ATT CTG CGC AGC		1563
491	K L Q A Q N Q W L Q D M T T H L I L R S		510
1564	TTT AAG GAG TTC CTG CAG TCC AGC CTG AGG GCT CTT CGG CAA ATG TAG CATGGGCACGTCGAC		1627
511	F K E F L Q S S L R A L R Q M		525

FIG. 1

1 GTCGACGC ATG GAG TGG TAG CCGAGGAGGAAGC ATG CTG GCC GTC GGC TGC GCG CTG CTG GCT 63
 1 M L A V G C A L L A 10
 64 GCC CTG CTG GCC GCG CCG GGA GCG GCG CTG GCC CCA AGG CGC TGC CCT GCG CAG GAG GTG 123
 11 A L L A A P G A A L A P R R C P A Q E V 30
 124 GCA AGA GGC GTG CTG ACC AGT CTG CCA GGA GAC AGC GTG ACT CTG ACC TGC CCG GGG GTA 183
 31 A R G V L T S L P G D S V T L T C P G V 50
 184 GAG CCG GAA GAC AAT GCC ACT GTT CAC TGG GTG CTC AGG AAG CCG GCT GCA GGC TCC CAC 243
 51 E P E D N A T V H W V L R K P A A G S H 70
 244 CCC AGC AGA TGG GCT GGC ATG GGA AGG AGG CTG CTG CTG AGG TCG GTG CAG CTC CAC GAC 303
 71 P S R W A G M G R R L L L R S V Q L H D 90
 304 TCT GGA AAC TAT TCA TGC TAC CGG GCC GGC CGC CCA GCT GGG ACT GTG CAC TTG CTG GTG 363
 91 S G N Y S C Y R A G R P A G T V H L L V 110
 364 GAT GTT CCC CCC GAG GAG CCC CAG CTC TCC TGC TGC CGG AAG AGC CCC CTC AGC AAT GTT 423
 111 D V P P E E P Q L S C F R K S P L S N V 130
 424 GTT TGT GAG TGG GGT CCT CGG AGC ACC CCA TCC CTG ACG ACA AAG GCT GTG CTC TTG GTG 483
 131 V C E W G P R S T P S L T T K A V L L V 150
 484 AGG AAG TTT CAG AAC AGT CCG GCC GAA GAC TTC CAG GAG CCG TGC CAG TAT TCC CAG GAG 543
 151 R K F Q N S P A E D F Q E P C Q Y S Q E 170
 544 TCC CAG AAG TTC TCC TGC CAG TTA GCA GTC CCG GAG GGA GAC AGC TCT TTC TAC ATA GTG 603
 171 S Q K F S C Q L A V P E G D S S F Y I V 190
 604 TCC ATG TGC GTC GCC AGT AGT GTC GGG AGC AAG TTC AGC AAA ACT CAA ACC TTT CAG GGT 663
 191 S M C V A S S V G S K F S K T Q T F Q G 210
 664 TGT GGA ATC TTG CAG CCT GAT CCG CCT GCC AAC ATC ACA GTC ACT GCC GTG GCC AGA AAC 723
 211 C G I L Q P D P P A N I T V T A V A R N 230
 724 CCC CGC TGG CTC AGT GTC ACC TGG CAA GAC CCC CAC TCC TGG AAC TCA TCT TAC TAC AGA 783
 231 P R W L S V T W Q D P H S W N S S F Y R 250
 784 CTA CGG TTT GAG CTC AGA TAT CGG GCT GAA CGG TCA AAG ACA TTC ACA ACA TGG ATG GTC 843
 251 L R F E L R Y R A E R S K T F T T W M V 270
 844 AAG GAC CTC CAG CAT CAC TGT GTC ATC CAC GAC GCC TGG AGC GGC CTG AGG CAC GTG GTG 903
 271 K D L Q H C V I H D A W S G L R H V V 290
 904 CAG CTT CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC GAG TGG AGC CCG GAG GCC 963
 291 Q L R A Q E E F G Q G E W S E W S P E A 310
 964 ATG GGC ACG CCT TGG ACA GAA TCC AGG AGT CCT CCA GCT CGA GGA GGT GGA GGT TCT GGA 1023
 311 M G T P W T E S R S P P A R G G G G S G 330
 1024 GGT GGA GGT TCT GTC GAG CCA GTA CCC CCA GGA GAA GAT TCC AAA GAT GTA GCC GCC CCA 1083
 331 G G G S V E P P G E D S K D V A A P 350
 1084 CAG AGA CAG CCA CTC ACC TCT TCA GAA CGA ATT GAC AAA CAA ATT CGG TAC ATC CTC GAC 1143
 351 H R Q P L T S E R I D K Q I R Y I L D 370
 1144 GGC ATC TCA GCC CTG AGA AAG GAG ACA TGT AAC AAG AGT AAC ATG TGT GAA AGC AGC AAA 1203
 371 G I S A L R K E T C N K S N M C E S S K 390
 1204 GAG GCA CTG GCA GAA AAC AAC CTG AAC CTT CCA AAG ATG GCT GAA AAA GAT GGA TGC TTC 1263
 391 E A L A E N N L P K M A E K D G C F 410
 1264 CAA TCT GGA TTC AAT GAG GAG ACT TGC CTG GTG AAA ATC ATC ACT GGT CTT TTG GAG TTT 1323
 411 Q S G F N E E T C L V K I I T G L L E F 430
 1324 GAG GTA TAC CTA GAG TAC CTC CAG AAC AGA TTT GAG AGT AGT GAG GAA CAA GCC AGA GCT 1383
 431 E V Y L E Y L Q N R F E S S E E Q A R A 450
 1384 GTG CAG ATG AGT ACA AAA GTC CTG ATC CAG TTC CTG CAG AAA AAG GCA AAG AAT CTA GAT 1443
 451 V Q M S T K V L I Q F L Q K K A K N L D 470
 1444 GCA ATA ACC ACC CCT GAC CCA ACC ACA AAT GCC AGC CTG CTG ACG AAG CTG CAG GCA CAG 1503
 471 A I T T P D P T T N A S L L T K L Q A Q 490
 1504 AAC CAG TGG CTG CAG GAC ATG ACA ACT CAT CTC ATT CTG CGC AGC TTT AAG GAG TTC CTG 1563
 491 N Q W L Q D M T T H L I L R S F K E F L 510
 1564 CAG TCC AGC CTG AGG GCT CTT CGG CAA ATG TAG C ATG GGC ACC GTC GAC 1612
 511 Q S S L R A L R Q M * 520

FIG. 2

Met	Asn	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	Ala	Phe	Gly	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Leu
Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Pro	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Pro	Pro
												1			
Gly	Glu	Asp	Ser	Lys	Asp	Val	Ala	Ala	Pro	His	Arg	Gln	Pro	Leu	Thr
5					10					15					20
Ser	Ser	Glu	Arg	Ile	Asp	Lys	Gln	Ile	Arg	Tyr	Ile	Leu	Asp	Gly	Ile
				25					30					35	
Ser	Ala	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Cys	Asn	Lys	Ser	Asn	Met	Cys	Glu	Ser
			40					45					50		
Ser	Pro	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Met	Ala
		55					60					65			
Glu	Lys	Asp	Gly	Cys	Phe	Gln	Ser	Gly	Phe	Asn	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu
	70					75					80				
Val	Lys	Ile	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	Val	Tyr	Leu	Glu	Tyr
85					90					95					100
Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	Val	Gln
				105					110					115	
Met	Ser	Thr	Lys	Val	Leu	Ile	Gln	Phe	Leu	Gln	Lys	Lys	Ala	Lys	Asn
			120					125					130		
Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu
		135					140					145			
Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Glu	Asp	Met	Pro	Thr	His
	150					155					160				
Leu	Ile	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Leu	Arg	Ala
165					170					175					180
Leu	Arg	Gln	Met												
			184												

FIG. 3

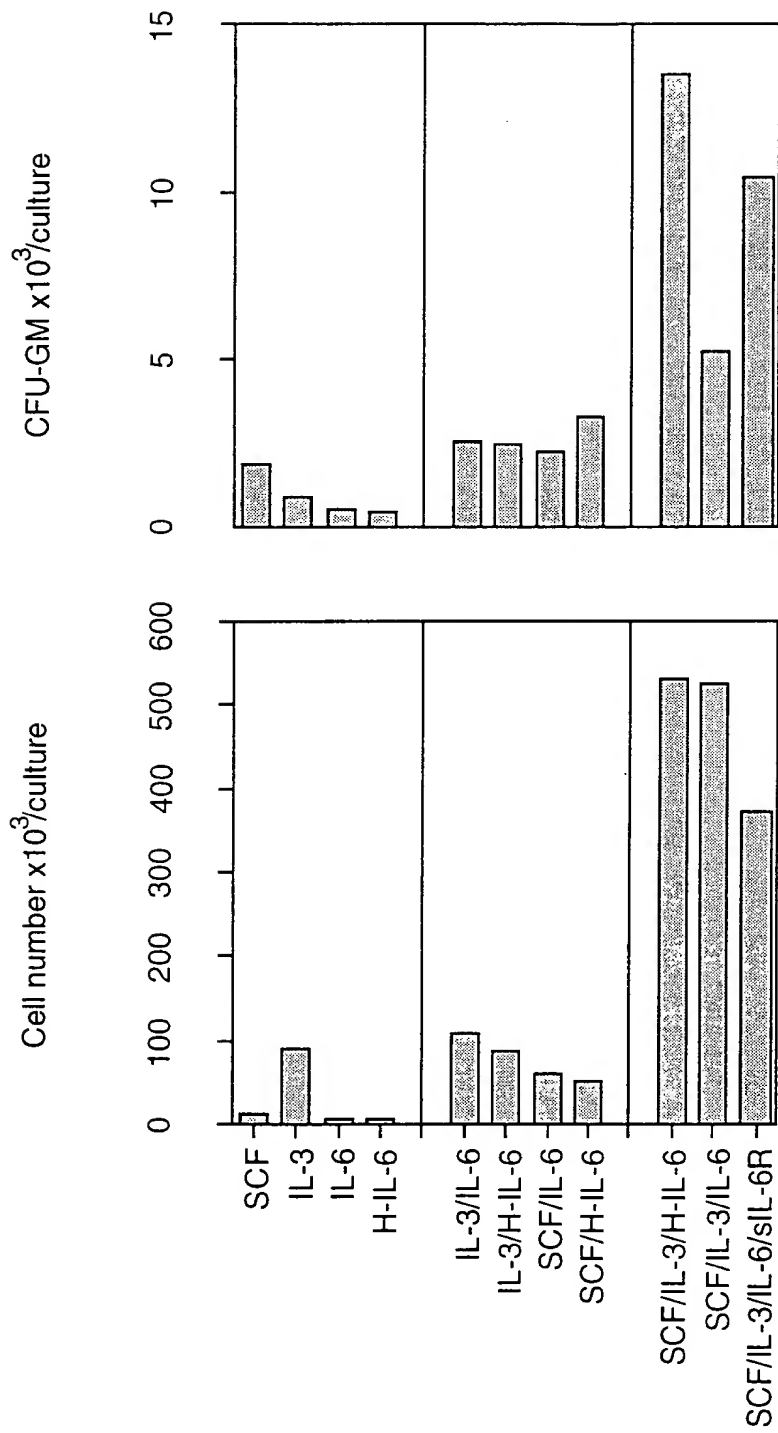


FIG. 4

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference A 2953	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE97/00458	International filing date (day/month/year) 07 March 1997 (07.03.1997)	Priority date (day/month/year) 07 March 1996 (07.03.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/24, 15/12, C07K 14/54, 14/715, 14/71, A61K 47/48, 38/17		
Applicant ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 October 1997 (02.10.1997)	Date of completion of this report 09 July 1998 (09.07.1998)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE97/00458

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1 - 10, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1 - 10, filed with the letter of 28 May 1998 (28.05.1998),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/4 - 4/4, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application N .
PCT/DE 97/00458

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The present application describes a fusion polypeptide (conjugate) in which the cytokine receptor IL-6R and the cytokine IL-6 are connected to each other by a polypeptide linker. Page 3 of the description merely mentions that the linker can be a disulphide bridge formed by two polypeptides.

The application further concerns the DNA coding for this fusion polypeptide, an expression plasmid comprising this DNA, a transformant containing the expression plasmid, and the use of the conjugate and the DNA, for example, for expansion and colony formation of human CD34+ cells.

2. The conjugate of claims 1 to 6 and the subject matter of claims 7 to 10 are not mentioned in any of the search report citations and are therefore to be considered novel.

3. D1 (WO-A-96/04314) describes MHC fusion complexes and expression vectors which code therefor. The MHC fusion complexes consist of an MHC molecule which is

connected to a "presenting" peptide by a **polypeptide link r**. These conjugates are used in the modulation of T-cell activities.

D2 (European Journal of Biochemistry, vol. 216, no. 1, 1993, pp. 239 to 245) describes the connection of **srhIL-6R** (recombinant-soluble human interleukin-6 receptor) to **IL-6** by **chemical cross-linkers** (page 241, left-hand column "Affinity cross-linking").

That document further mentions the effects which can be produced by the CNTF receptor together with CNTF.

D3 (Journal of Immunology, vol. 153, no. 4, 1994, pp. 1744 to 1753) likewise describes conjugates in which **IL-6** and **IL-6R** are connected by a **cross-linker** and their possible use.

D4 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92, 1995, pp. 2859 to 2863) describes the effects of **sIL-6R/IL-6** in the presence of SCF on hemopoietic progenitor cells and CD34+ cells. The effects observed are that **sIL-6R/IL-6** stimulates the expansion of these cells dramatically.

The problem of overcoming disturbed interactions between proteins, in particular in an incomplete **IL-6R**, appears to have already been solved by D4. The problem addressed by the application can therefore be regarded only as the preparation of a further agent for solving this problem, the preparation of this further agent being less costly and less complex than in D4.

The present solution to this problem, a fusion polypeptide in which IL-6R and IL-6 or CNTF receptor and CNTF are connected to each other by a polypeptide, is obvious from a combination of the teachings of D4 and D1 or D2 and D1 or D3 and D1. Therefore the subject matter of claims 1 to 10 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

4. The PCT contains no uniform criteria for assessing the industrial applicability of claims 1 to 10 in their present form. Patentability may also depend on the wording of the claims. The EPO does not, for example, recognize the industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or to the use of such a compound to manufacture a drug for a new medical treatment.
5. Although the description of the present application formally mentions (a) conjugates in which the linker can be a disulphite bridge and (b) conjugates X consisting of CNTF receptors and CNTF, the description contains neither embodiments of these conjugates (a) nor examples demonstrating the actual efficacy of these conjugates (b). Therefore the subject matter of claims 1 to 4 and 5 to 10, in so far as it relates to claim 1 (disulphide bridge)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 97/00458

and/or claim 5 (CNTF), is insufficiently disclosed
and is not fully supported by the description (PCT
Article 5 and PCT Article 6).

Replaced
By
Article 34

Replaced by Article 34

12

Rec'd on 08 Sep 98

Claims

1. A conjugate comprising two polypeptides with a mutual affinity, wherein the polypeptides are linked with each other via a linker.
2. The conjugate according to claim 1, characterized in that one polypeptide is a receptor and the other polypeptide is a ligand binding the receptor.
3. The conjugate according to claim 2, characterized in that the receptor is present in the form of its subunit binding the ligand.
4. The conjugate according to claim 2 or 3, characterized in that the ligand is present in the form of its subunit binding the receptor.
5. The conjugate according to any one of claims 2 to 4, characterized in that the receptor is a cytokine receptor and the ligand is a cytokine.
6. The conjugate according to claim 5, characterized in that the cytokine receptor is an IL-6 receptor and the cytokine is an IL-6.
7. The conjugate according to claim 5, characterized in that the cytokine receptor is a CNTF receptor and the cytokine is a CNTF.
8. The conjugate according to any one of claims 1 to 7, characterized in that the linker is a disulfide bridge formed by two polypeptides.
9. The conjugate according to any one of claims 1 to 7, characterized in that the linker is a bifunctional chemical cross linker.

10. The conjugate according to any one of claims 1 to 7, characterized in that the conjugate is a fusion polypeptide.
11. The conjugate according to claim 10, characterized in that the linker is a polypeptide which links the two other polypeptides with each other.
12. DNA coding for the conjugate according to claim 10 or 11.
13. An expression plasmid comprising the DNA according to claim 12.
14. A transformant containing the expression plasmid according to claim 13.
15. Use of the conjugate according to any one of claims 1 to 11 and the DNA according to claim 12 for influencing the interactions between proteins.

PCT/DE/97/00458 08 SEP 1999
**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
 GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts A 2953	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE97/00458	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/03/1997	Priority date (Tag/Monat/Jahr) 07/03/1996
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/62		
Anmelder ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE...et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 02/10/1997	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 09.07.98
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465 </div> </div>	Bevollmächtigter Bediensteter Heimann-Pohl, B Telefon (+49-89) 2399-8713



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE97/00458

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-10 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-10 eingegangen am 29/05/1998 mit Schreiben vom 28/05/1998

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-10
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche
	Nein: Ansprüche 1-10
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-9
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

- 1). Die vorliegende Anmeldung beschreibt ein Fusionspolypeptid (Konjugat) in dem der Zytokin-Rezeptor, IL-6R und das Zytokin IL-6 durch einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden ist. Auf Seite 3 der Beschreibung wird lediglich erwähnt, dass der Linker eine durch zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke darstellen könnte.
Ferner betrifft die Anmeldung die für dieses Fusionspolypeptid kodierende DNA, ein Expressionsplasmid, das diese DNA umfaßt, eine Transformante, die das Expressionsplasmid enthält, sowie die Verwendung des Konjugats und der DNA, z.B. zur Expansion und Koloniebildung von humanen CD34⁺-Zellen.
- 2). Das Konjugat der Ansprüche 1-6 sowie der Gegenstand der Ansprüche 7-10 wird in keinem der im Recherchenbericht zitierten Dokumente erwähnt und ist somit als neu anzusehen.
- 3). D1 (WO/A,96 04314) beschreibt MHC-Fusionskomplexe und Expressionsvektoren, die für diese kodieren. Die MHC-Fusionskomplexe bestehen aus einem MHC Molekül, das über einen **Polypeptidlinker** mit einem "presenting" Peptide verbunden ist. Diese Konjugate finden in der Modulation von T Zell-Aktivitäten Verwendung.

D2 (European Journal of Biochemistry, Bd. 216, Nr. 1, 1993, Seiten 239-245) beschreibt die Verbindung von **srhIL-6R** (recombinant-soluble human interleukin-6 receptor) mit **IL-6** durch **chemische Cross-Linker** (Seite 241 linke Spalte "Affinity cross-linking").
Ferner werden in diesem Dokument die Effekte erwähnt, die durch den CNFT Rezeptor zusammen mit CNFT hervorgerufen werden können.

D3 (Journal of Immunology, Bd. 153, Nr. 4, 1994, Seiten 1744-1753) beschreibt ebenfalls Konjugate, in denen **IL-6** und **IL-6R** durch einen **Cross-Linker** verbunden sind, sowie deren mögliche Verwendung.

D4 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Bd. 92, 1995, Seiten 2859-2863) beschreibt die Effekte von **sIL-6R/IL-6** in Gegenwart von SCF auf hemopoietische Progenitorzellen und CD34⁺-Zellen. Die beobachteten Effekte bestehen darin, daß sIL-6R/IL-6 die Expansion dieser Zellen dramatisch stimuliert.

Das Problem, gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen, insbesondere bei einem unvollständigen IL-6R, zu beheben, scheint bereits durch D4 gelöst. Die der Anmeldung zugrundeliegende Aufgabe kann daher nur in der Bereitstellung eines weiteren Mittels zur Lösung dieser Aufgabe gesehen werden, wobei die Bereitstellung dieses weiteren Mittels weniger kosten- und zeitaufwendig sein sollte als in D4.

Die vorliegende Lösung dieser Aufgabe, ein Fusionspolypeptid, in dem IL-6R und IL-6 oder CNFT Rezeptor und CNFT durch ein Polypeptid miteinander verbunden sind, ergibt sich in naheliegender Weise aus der Kombination der Lehren aus D4 und D1 **oder** D2 und D1 **oder** D3 und D1. Daher beruht der Gegenstand der Ansprüche 1-10 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Art. 33 (3) PCT).

- 4). Für die Beurteilung der Frage, ob der Gegenstand des vorliegenden Anspruchs 10 gewerblich anwendbar ist, enthält der PCT keine eindeutigen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.
- 5). In der Beschreibung der vorliegenden Anmeldung sind zwar **a)** Konjugate, in denen der Linker eine Disulfidbrücke sein kann und **b)** Konjugate bestehend aus CNTF-Rezeptor und CNFT formal erwähnt, jedoch enthält die Beschreibung weder Beispiele zur Ausführung dieser Konjugate (**a)**), noch Beispiele, die die tatsächliche Wirksamkeit dieser Konjugate (**b)**) zeigen. Daher scheint der Gegenstand der Ansprüche 1-4 und 5-10, soweit er sich auf Anspruch 1 (Disulfidbrücke) und/oder Anspruch 5 (CNFT) bezieht, nicht ausreichend offenbart und in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt (Art. 5/Art. 6 PCT).

Amtl. Aktenzeichen: PCT/DE97/00458
Unser Zeichen: A 2953 - hu / msl

Patentansprüche

1. Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide, wobei das eine Polypeptid ein Zytokin-Rezeptor und das andere ein Zytokin als Ligand ist und die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke oder ein Polypeptid ist.
2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor in Form seiner den Liganden bindenden Untereinheit vorliegt.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand in Form seiner den Rezeptor bindenden Untereinheit vorliegt.
4. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein IL-6 Rezeptor und das Zytokin ein IL-6 ist.
5. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein CNTF-Rezeptor und das Zytokin ein CNTF ist.
6. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat ein Fusionspolypeptid ist.
7. DNA, kodierend für das Konjugat nach Anspruch 6.
8. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 7.
9. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 8.

10. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1-6 und der DNA nach Anspruch 7 zur Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ _____

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts A 2953
Internationales Aktenzeichen PCT/DE97/00458	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 7. März 1997	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 7. März 1996
Bezeichnung der Erfindung Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH Rischerstr.12 69123 Heidelberg		Telefonnr.: Telefaxnr.: Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) ROSE-JOHN, Stefan I.Medizinische Klinik-Abt. Pathophysiologie Johannes Gutenberg-Universität Mainz Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung Obere Zahlbacherstr. 63 55101 Mainz		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)		
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

- Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
- und ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.
- ☐ wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
- ☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Dr. Bernard Huber

HUBER & SCHÜSSLER
 Patentanwälte · Patent Attorneys
 Truderlanger Straße 246 · 81825 München
 Tel. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

- ☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde*

- i) ☒ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34
- ☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
 - ☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
 - ☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
- berücksichtigt.
- iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). (Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

- ☒ Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind) ausgenommen
-
-
- (Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

- | | | |
|---|---|---------|
| 1. Änderungen nach Artikel 34 | | |
| Beschreibung | : | Blätter |
| Ansprüche | : | Blätter |
| Zeichnungen | : | Blätter |
| 2. Begleitschreiben zu den Änderungen nach Artikel 34 | : | Blätter |
| 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 5. Sonstige (<i>einzeln auführen</i>) : | : | Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|--|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht | 5. <input checked="" type="checkbox"/> sonstige (<i>einzeln auführen</i>): |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift | |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Dr. Bernhard Höber

2. Okt. 1997

Patentanwalt

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

- | | |
|--|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS: | |
| 2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b): | |
| 3. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung. | <input type="checkbox"/> Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet |
| 4. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5. | |
| 5. <input type="checkbox"/> Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT. | |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

HUBER & SCHÜSSLER
Patentanwälte · Patent Attorneys

Huber & Schüssler · Truderinger Straße 246 · 81825 München

Europäisches Patentamt

80298 München

28 Rec'd PCT/PTO 08 SEP 1998

Aktenzeichen: PCT/DE97/00458

Anmelder: Angewandte Gentechnologie... et al.

Unser Zeichen: A 2953 - sch / km

Dr. Bernard Huber
Dipl.-Biologe
Dr. Andrea Schüssler
Dipl.-Chemikerin
European Patent Attorney
European Trademark Attorney

Truderinger Straße 246
81825 München

Tel. 089 / 42 72 47 48
Fax 089 / 42 72 47 49

In Zusammenarbeit mit Patentanwalt
Dr. Klaus Castell
Dipl.-Ingenieur
Schillingsstraße 335
52355 Düren

1. September 1997

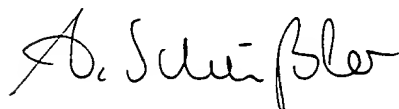
Auf die Aufforderung zur Vorlage des Protokolls einer Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenz vom 30. Juni 1997 werden anbei eingereicht:

- ein Sequenzprotokoll,
- ein Sequenzprotokoll in Computer-lesbarer Form und
- eine Erklärung gemäß Regel 13^{ter}.1 (b) PCT.

Die auf Seite 6, Abs. 3 und 4 der vorliegenden Anmeldung angegebenen Aminosäuresequenzen sind bereits Bestandteil der Sequenzen 1 und 2 des Sequenzprotokolls. Daher wird für diese Aminosäuresequenzen keine separate Sequenz angegeben.

Es wird angenommen, daß mit vorstehenden Unterlagen die Erfordernisse zur Einreichung eines Sequenzprotokolls erfüllt sind. Sollten jedoch noch Änderungen nötig sein, so wird um eine entsprechende Aufforderung oder telefonische Rücksprache gebeten.

Europäische Patentvertreterin



Dr. Andrea Schüssler

Anlagen:
wie erwähnt

Erklärung gemäß Regel 13^{ter}.1 (b) PCT

Es wird hiermit erklärt, daß das Sequenzprotokoll nicht über den Inhalt der Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.

Es wird weiterhin erklärt, daß die auf dem Datenträger gespeicherten Informationen mit dem schriftlichen Sequenzprotokoll übereinstimmen.

Europäische Patentvertreterin


Dr. Andrea Schüßler

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH
- (B) STRASSE: Rischerstr. 12
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69123

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: PCT/DE97/00458

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 196 08 813.5
- (B) ANMELDETAG: 07-MÄR-1996

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1627 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
- (B) LAGE:34..90

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE:91..1608

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:34..1608

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GTCGACGCAT	GGAGTGGTAG	CCGAGGAGGA	AGC	ATG	CTG	GCC	GTC	GGC	TGC	GCG							54
				Met	Leu	Ala	Val	Gly	Cys	Ala							
				-19				-15									
CTG	CTG	GCT	GCC	CTG	CTG	GCC	GCG	CCG	GGA	GCG	GCG	CTG	GCC	CCA	AGG		102
Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Pro	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Pro	Arg		
		-10					-5					1					
CGC	TGC	CCT	GCG	CAG	GAG	GTG	GCA	AGA	GGC	GTG	CTG	ACC	AGT	CTG	CCA		150
Arg	Cys	Pro	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Arg	Gly	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Pro		
5				10						15					20		
GGA	GAC	AGC	GTG	ACT	CTG	ACC	TGC	CCG	GGG	GTA	GAG	CCG	GAA	GAC	AAT		198
Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Pro	Gly	Val	Glu	Pro	Glu	Asp	Asn		
				25					30					35			
GCC	ACT	GTT	CAC	TGG	GTG	CTC	AGG	AAG	CCG	GCT	GCA	GGC	TCC	CAC	CCC		246
Ala	Thr	Val	His	Trp	Val	Leu	Arg	Lys	Pro	Ala	Ala	Gly	Ser	His	Pro		
			40					45					50				
AGC	AGA	TGG	GCT	GGC	ATG	GGA	AGG	AGG	CTG	CTG	CTG	AGG	TCG	GTG	CAG		294
Ser	Arg	Trp	Ala	Gly	Met	Gly	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Val	Gln		
		55					60					65					
CTC	CAC	GAC	TCT	GGA	AAC	TAT	TCA	TGC	TAC	CGG	GCC	GGC	CGC	CCA	GCT		342
Leu	His	Asp	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Tyr	Arg	Ala	Gly	Arg	Pro	Ala		
	70					75					80						
GGG	ACT	GTG	CAC	TTG	CTG	GTG	GAT	GTT	CCC	CCC	GAG	GAG	CCC	CAG	CTC		390
Gly	Thr	Val	His	Leu	Leu	Val	Asp	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu		
85				90					95					100			
TCC	TGC	TTC	CGG	AAG	AGC	CCC	CTC	AGC	AAT	GTT	GTT	TGT	GAG	TGG	GGT		438
Ser	Cys	Phe	Arg	Lys	Ser	Pro	Leu	Ser	Asn	Val	Val	Cys	Glu	Trp	Gly		
				105					110					115			
CGC	CGG	AGC	ACC	CCA	TCC	CTG	ACG	ACA	AAG	GCT	GTG	CTC	TTG	GTG	AGG		486
Pro	Arg	Ser	Thr	Pro	Ser	Leu	Thr	Thr	Lys	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Arg		
			120					125					130				
AAG	TTT	CAG	AAC	AGT	CCG	GCC	GAA	GAC	TTC	CAG	GAG	CCG	TGC	CAG	TAT		534
Lys	Phe	Gln	Asn	Ser	Pro	Ala	Glu	Asp	Phe	Gln	Glu	Pro	Cys	Gln	Tyr		
		135					140					145					
TCC	CAG	GAG	TCC	CAG	AAG	TTC	TCC	TGC	CAG	TTA	GCA	GTC	CCG	GAG	GGA		582
Ser	Gln	Glu	Ser	Gln	Lys	Phe	Ser	Cys	Gln	Leu	Ala	Val	Pro	Glu	Gly		
	150					155					160						
GAC	AGC	TCT	TTC	TAC	ATA	GTG	TCC	ATG	TGC	GTC	GCC	AGT	AGT	GTC	GGG		630
Asp	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ile	Val	Ser	Met	Cys	Val	Ala	Ser	Ser	Val	Gly		
165				170						175					180		
AGC	AAG	TTC	AGC	AAA	ACT	CAA	ACC	TTT	CAG	GGT	TGT	GGA	ATC	TTG	CAG		678
Ser	Lys	Phe	Ser	Lys	Thr	Gln	Thr	Phe	Gln	Gly	Cys	Gly	Ile	Leu	Gln		
				185					190					195			

CCT Pro	GAT Asp	CCG Pro	CCT Pro 200	GCC Ala	AAC Asn	ATC Ile	ACA Thr	GTC Val 205	ACT Thr	GCC Ala	GTG Val	GCC Ala	AGA Arg 210	AAC Asn	CCC Pro	726
CGC Arg	TGG Trp	CTC Leu 215	AGT Ser	GTC Val	ACC Thr	TGG Trp	CAA Gln 220	GAC Asp	CCC Pro	CAC His	TCC Ser	TGG Trp 225	AAC Asn	TCA Ser	TCT Ser	774
TTC Phe	TAC Tyr 230	AGA Arg	CTA Leu	CGG Arg	TTT Phe	GAG Glu 235	CTC Leu	AGA Arg	TAT Tyr	CGG Arg	GCT Ala 240	GAA Glu	CGG Arg	TCA Ser	AAG Lys	822
ACA Thr 245	TTC Phe	ACA Thr	ACA Thr	TGG Trp	ATG Met 250	GTC Val	AAG Lys	GAC Asp	CTC Leu	CAG Gln 255	CAT His	CAC His	TGT Cys	GTC Val	ATC Ile 260	870
CAC His	GAC Asp	GCC Ala	TGG Trp	AGC Ser 265	GGC Gly	CTG Leu	AGG Arg	CAC His	GTG Val 270	GTG Val	CAG Gln	CTT Leu	CGT Arg	GCC Ala 275	CAG Gln	918
GAG Glu	GAG Glu	TTC Phe	GGG Gly 280	CAA Gln	GGC Gly	GAG Glu	TGG Trp	AGC Ser 285	GAG Glu	TGG Trp	AGC Ser	CCG Pro	GAG Glu 290	GCC Ala	ATG Met	966
GGC Gly	ACG Thr	CCT Pro 295	TGG Trp	ACA Thr	GAA Glu	TCC Ser	AGG Arg 300	AGT Ser	CCT Pro	CCA Pro	GCT Ala	CGA Arg 305	GGA Gly	GGT Gly	GGA Gly	1014
GGT Gly 310	TCT Ser	GGA Gly	GGT Gly	GGA Gly	GGT Gly	TCT Ser 315	GGA Gly	GGT Gly	GGA Gly	GGT Gly	TCT Ser 320	GTC Val	GAG Glu	CCA Pro	GTA Val	1062
CCC Pro 325	CCA Pro	GGA Gly	GAA Glu	GAT Asp	TCC Ser 330	AAA Lys	GAT Asp	GTA Val	GCC Ala	GCC Ala 335	CCA Pro	CAC His	AGA Arg	CAG Gln	CCA Pro 340	1110
CTC Leu	ACC Thr	TCT Ser	TCA Ser	GAA Glu 345	CGA Arg	ATT Ile	GAC Asp	AAA Lys	CAA Gln 350	ATT Ile	CGG Arg	TAC Tyr	ATC Ile	CTC Leu 355	GAC Asp	1158
GGC Gly	ATC Ile	TCA Ser	GCC Ala 360	CTG Leu	AGA Arg	AAG Lys	GAG Glu	ACA Thr 365	TGT Cys	AAC Asn	AAG Lys	AGT Ser	AAC Asn 370	ATG Met	TGT Cys	1206
GAA Glu	AGC Ser	AGC Ser	AAA Lys 375	GAG Glu	GCA Ala	CTG Leu	GCA Ala 380	GAA Glu	AAC Asn	AAC Asn	CTG Leu	AAC Asn 385	CTT Leu	CCA Pro	AAG Lys	1254
ATG Met 390	GCT Ala	GAA Glu	AAA Lys	GAT Asp	GGA Gly	TGC Cys 395	TTC Phe	CAA Gln	TCT Ser	GGA Gly	TTC Phe 400	AAT Asn	GAG Glu	GAG Glu	ACT Thr	1302
TGC Cys 405	CTG Leu	GTG Val	AAA Lys	ATC Ile	ATC Ile 410	ACT Thr	GGT Gly	CTT Leu	TTG Leu	GAG Glu 415	TTT Phe	GAG Glu	GTA Val	TAC Tyr	CTA Leu 420	1350

GAG TAC CTC CAG AAC AGA TTT GAG AGT AGT GAG GAA CAA GCC AGA GCT	1398
Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala	
425 430 435	
GTG CAG ATG AGT ACA AAA GTC CTG ATC CAG TTC CTG CAG AAA AAG GCA	1446
Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala	
440 445 450	
AAG AAT CTA GAT GCA ATA ACC ACC CCT GAC CCA ACC ACA AAT GCC AGC	1494
Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser	
455 460 465	
CTG CTG ACG AAG CTG CAG GCA CAG AAC CAG TGG CTG CAG GAC ATG ACA	1542
Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr	
470 475 480	
ACT CAT CTC ATT CTG CGC AGC TTT AAG GAG TTC CTG CAG TCC AGC CTG	1590
Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu	
485 490 495 500	
AGG GCT CTT CGG CAA ATG TAGCATGGGC ACCGTCGAC	1627
Arg Ala Leu Arg Gln Met	
505	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1612 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
- (B) LAGE:34..90

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:34..1593

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE:91..1593

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GTCGACGCAT GGAGTGGTAG CCGAGGAGGA AGC ATG CTG GCC GTC GGC TGC GCG	54
Met Leu Ala Val Gly Cys Ala	

CTG Leu	CTG Leu	GCT Ala -10	GCC Ala	CTG Leu	CTG Leu	GCC Ala	GCG Ala -5	CCG Pro	GGA Gly	GCG Ala	GCG Ala	CTG Leu 1	GCC Ala	CCA Pro	AGG Arg	102
CGC Arg 5	TGC Cys	CCT Pro	GCG Ala	CAG Gln 10	GAG Glu 10	GTG Val	GCA Ala	AGA Arg	GGC Gly	GTG Val 15	CTG Leu	ACC Thr	AGT Ser	CTG Leu	CCA Pro 20	150
GGA Gly	GAC Asp	AGC Ser	GTG Val 25	ACT Thr 25	CTG Leu	ACC Thr	TGC Cys	CCG Pro	GGG Gly 30	GTA Val	GAG Glu	CCG Pro	GAA Glu 35	GAC Asp 35	AAT Asn	198
GCC Ala	ACT Thr	GTT Val 40	CAC His 40	TGG Trp	GTG Val	CTC Leu	AGG Arg	AAG Lys 45	CCG Pro	GCT Ala	GCA Ala	GGC Gly 50	TCC Ser 50	CAC His	CCC Pro	246
AGC Ser	AGA Arg	TGG Trp 55	GCT Ala	GGC Gly	ATG Met	GGA Gly	AGG Arg 60	AGG Arg	CTG Leu	CTG Leu	CTG Leu	AGG Arg 65	TCG Ser	GTG Val	CAG Gln	294
CTC Leu 70	CAC His 70	GAC Asp	TCT Ser	GGA Gly	AAC Asn 75	TAT Tyr 75	TCA Ser	TGC Cys	TAC Tyr	CGG Arg	GCC Ala 80	GGC Gly	CGC Arg	CCA Pro	GCT Ala	342
GGG Gly 85	ACT Thr	GTG Val	CAC His	TTG Leu 90	CTG Leu 90	GTG Val	GAT Asp	GTT Val	CCC Pro	CCC Pro 95	GAG Glu	GAG Glu	CCC Pro	CAG Gln	CTC Leu 100	390
TCC Ser	TGC Cys	TTC Phe	CGG Arg 105	AAG Lys 105	AGC Ser	CCC Pro	CTC Leu	AGC Ser	AAT Asn 110	GTT Val	GTT Val	TGT Cys	GAG Glu 115	TGG Trp 115	GGT Gly	438
CCT Pro	CGG Arg	AGC Ser	ACC Thr 120	CCA Pro	TCC Ser	CTG Leu	ACG Thr 125	ACA Thr	AAG Lys	GCT Ala	GTG Val	CTC Leu	TTG Leu 130	GTG Val	AGG Arg	486
AAG Lys 135	TTT Phe	CAG Gln 135	AAC Asn	AGT Ser	CCG Pro	GCC Ala	GAA Glu 140	GAC Asp	TTC Phe	CAG Gln	GAG Glu	CCG Pro 145	TGC Cys	CAG Gln	TAT Tyr	534
TCC Ser 150	CAG Gln	GAG Glu	TCC Ser	CAG Gln	AAG Lys	TTC Phe 155	TCC Ser	TGC Cys	CAG Gln	TTA Leu	GCA Ala 160	GTC Val	CCG Pro	GAG Glu	GGA Gly	582
GAC Asp 165	AGC Ser	TCT Ser	TTC Phe	TAC Tyr 170	ATA Ile 170	GTG Val	TCC Ser	ATG Met	TGC Cys	GTC Val 175	GCC Ala	AGT Ser	AGT Ser	GTC Val	GGG Gly 180	630
AGC Ser	AAG Lys	TTC Phe	AGC Ser	AAA Lys 185	ACT Thr	CAA Gln	ACC Thr	TTT Phe	CAG Gln 190	GGT Gly	TGT Cys	GGA Gly	ATC Ile	TTG Leu 195	CAG Gln	678
CCT Pro	GAT Asp	CCG Pro	CCT Pro 200	GCC Ala	AAC Asn	ATC Ile	ACA Thr	GTC Val 205	ACT Thr	GCC Ala	GTG Val	GCC Ala	AGA Arg 210	AAC Asn	CCC Pro	726

CGC Arg	TGG Trp	CTC Leu 215	AGT Ser	GTC Val	ACC Thr	TGG Trp	CAA Gln 220	GAC Asp	CCC Pro	CAC His	TCC Ser	TGG Trp 225	AAC Asn	TCA Ser	TCT Ser	774
TTC Phe	TAC Tyr 230	AGA Arg	CTA Leu	CGG Arg	TTT Phe	GAG Glu 235	CTC Leu	AGA Arg	TAT Tyr	CGG Arg	GCT Ala 240	GAA Glu	CGG Arg	TCA Ser	AAG Lys	822
ACA Thr 245	TTC Phe	ACA Thr	ACA Thr	TGG Trp	ATG Met 250	GTC Val	AAG Lys	GAC Asp	CTC Leu	CAG Gln 255	CAT His	CAC His	TGT Cys	GTC Val	ATC Ile 260	870
CAC His	GAC Asp	GCC Ala	TGG Trp	AGC Ser 265	GGC Gly	CTG Leu	AGG Arg	CAC His	GTG Val 270	GTG Val	CAG Gln	CTT Leu	CGT Arg	GCC Ala 275	CAG Gln	918
GAG Glu	GAG Glu	TTC Phe	GGG Gly 280	CAA Gln	GGC Gly	GAG Glu	TGG Trp	AGC Ser 285	GAG Glu	TGG Trp	AGC Ser	CCG Pro	GAG Glu 290	GCC Ala	ATG Met	966
GGC Gly	ACG Thr	CCT Pro 295	TGG Trp	ACA Thr	GAA Glu	TCC Ser 300	AGG Arg	AGT Ser	CCT Pro	CCA Pro	GCT Ala	CGA Arg 305	GGA Gly	GGT Gly	GGA Gly	1014
GGT Gly 310	TCT Ser	GGA Gly	GGT Gly	GGA Gly	GGT Gly 315	TCT Ser	GTC Val	GAG Glu	CCA Pro	GTA Val	CCC Pro 320	CCA Pro	GGA Gly	GAA Glu	GAT Asp	1062
TCC Ser 325	AAA Lys	GAT Asp	GTA Val	GCC Ala	GCC Ala 330	CCA Pro	CAC His	AGA Arg	CAG Gln	CCA Pro 335	CTC Leu	ACC Thr	TCT Ser	TCA Ser	GAA Glu 340	1110
CGA Arg	ATT Ile	GAC Asp	AAA Lys	CAA Gln 345	ATT Ile	CGG Arg	TAC Tyr	ATC Ile	CTC Leu 350	GAC Asp	GGC Gly	ATC Ile	TCA Ser	GCC Ala 355	CTG Leu	1158
AGA Arg	AAG Lys	GAG Glu	ACA Thr 360	TGT Cys	AAC Asn	AAG Lys	AGT Ser	AAC Asn 365	ATG Met	TGT Cys	GAA Glu	AGC Ser	AGC Ser 370	AAA Lys	GAG Glu	1206
GCA Ala	CTG Leu	GCA Ala 375	GAA Glu	AAC Asn	AAC Asn	CTG Leu	AAC Asn 380	CTT Leu	CCA Pro	AAG Lys	ATG Met 385	GCT Ala	GAA Glu	AAA Lys	GAT Asp	1254
GGA Gly 390	TGC Cys	TTC Phe	CAA Gln	TCT Ser	GGA Gly 395	TTC Phe	AAT Asn	GAG Glu	GAG Glu	ACT Thr	TGC Cys 400	CTG Leu	GTG Val	AAA Lys	ATC Ile	1302
ATC Ile 405	ACT Thr	GGT Gly	CTT Leu	TTG Leu	GAG Glu 410	TTT Phe	GAG Glu	GTA Val	TAC Tyr	CTA Leu 415	GAG Glu	TAC Tyr	CTC Leu	CAG Gln	AAC Asn 420	1350
AGA Arg	TTT Phe	GAG Glu	AGT Ser	AGT Ser 425	GAG Glu	GAA Glu	CAA Gln	GCC Ala	AGA Arg 430	GCT Ala	GTG Val	CAG Gln	ATG Met	AGT Ser 435	ACA Thr	1398

AAA GTC CTG ATC CAG TTC CTG CAG AAA AAG GCA AAG AAT CTA GAT GCA	1446
Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala	
440 445 450	
ATA ACC ACC CCT GAC CCA ACC ACA AAT GCC AGC CTG CTG ACG AAG CTG	1494
Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu	
455 460 465	
CAG GCA CAG AAC CAG TGG CTG CAG GAC ATG ACA ACT CAT CTC ATT CTG	1542
Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu	
470 475 480	
CGC AGC TTT AAG GAG TTC CTG CAG TCC AGC CTG AGG GCT CTT CGG CAA	1590
Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln	
485 490 495 500	
ATG TAGCATGGGC ACCGTCGAC	1612
Met	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 212 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu	
1 5 10 15	
Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro	
20 25 30	
Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr	
35 40 45	
Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile	
50 55 60	
Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser	
65 70 75 80	
Ser Pro Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala	
85 90 95	
Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu	
100 105 110	

Val	Lys	Ile	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	Val	Tyr	Leu	Glu	Tyr
		115					120					125			
Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	Val	Gln
		130					135				140				
Met	Ser	Thr	Lys	Val	Leu	Ile	Gln	Phe	Leu	Gln	Lys	Lys	Ala	Lys	Asn
					150					155					160
Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu
				165					170					175	
Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Glu	Asp	Met	Pro	Thr	His
			180					185					190		
Leu	Ile	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Leu	Arg	Ala
		195					200					205			
Leu	Arg	Gln	Met												
		210													

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TAATACGACT CACTATAGGG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CCGCTCGAGC TGGAGGACTC CTGGA

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CGGCTCGAGC CAGTACCCCC AGGAGAA

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ACAGAAGT AAGGTTCTT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

TCGAGGAGGT GGAGGTTCTG GAGGTGGAGG TTCTGGAGGT GGAGGTTCTG

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TCGACAGAAC CTCCACCTCC AGAACCTCCA CCTCCAGAAC CTCCACCTCC

50

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

TCGAGGAGGT GGAGGTTCTG GAGGTGGAGG TTCTG

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

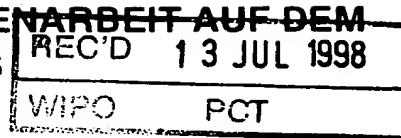
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

TCGACAGAAC CTCCACCTCC AGAACCTCCA CCTCC

35

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS



PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts A 2953	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE97/00458	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/03/1997	Priority date (Tag/Monat/Jahr) 07/03/1996
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/62		
Anmelder ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE...et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.



2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 02/10/1997	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 09.07.98
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Heimann-Pohl, B Telefon (+49-89) 2399-8713 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE97/00458

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-10 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-10 eingegangen am 29/05/1998 mit Schreiben vom 28/05/1998

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-10
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche
	Nein: Ansprüche 1-10
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-9
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

- 1). Die vorliegende Anmeldung beschreibt ein Fusionspolypeptid (Konjugat) in dem der Zytokin-Rezeptor, IL-6R und das Zytokin IL-6 durch einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden ist. Auf Seite 3 der Beschreibung wird lediglich erwähnt, dass der Linker eine durch zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke darstellen könnte.
Ferner betrifft die Anmeldung die für dieses Fusionspolypeptid kodierende DNA, ein Expressionsplasmid, das diese DNA umfaßt, eine Transformante, die das Expressionsplasmid enthält, sowie die Verwendung des Konjugats und der DNA, z.B. zur Expansion und Koloniebildung von humanen CD34⁺-Zellen.
- 2). Das Konjugat der Ansprüche 1-6 sowie der Gegenstand der Ansprüche 7-10 wird in keinem der im Recherchenbericht zitierten Dokumente erwähnt und ist somit als neu anzusehen.
- 3). D1 (WO/A,96 04314) beschreibt MHC-Fusionskomplexe und Expressionsvektoren, die für diese kodieren. Die MHC-Fusionskomplexe bestehen aus einem MHC Molekül, das über einen **Polypeptidlinker** mit einem "presenting" Peptide verbunden ist. Diese Konjugate finden in der Modulation von T Zell-Aktivitäten Verwendung.

D2 (European Journal of Biochemistry, Bd. 216, Nr. 1, 1993, Seiten 239-245) beschreibt die Verbindung von **srhIL-6R** (recombinant-soluble human interleukin-6 receptor) mit **IL-6** durch **chemische Cross-Linker** (Seite 241 linke Spalte "Affinity cross-linking").
Ferner werden in diesem Dokument die Effekte erwähnt, die durch den CNFT **Rezeptor** zusammen mit CNFT hervorgerufen werden können.

D3 (Journal of Immunology, Bd. 153, Nr. 4, 1994, Seiten 1744-1753) beschreibt ebenfalls Konjugate, in denen **IL-6** und **IL-6R** durch einen **Cross-Linker** verbunden sind, sowie deren mögliche Verwendung.

D4 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Bd. 92, 1995, Seiten 2859-2863) beschreibt die Effekte von **sIL-6R/IL-6** in Gegenwart von SCF auf hemopoietische Progenitorzellen und CD34⁺-Zellen. Die beobachteten Effekte bestehen darin, daß sIL-6R/IL-6 die Expansion dieser Zellen dramatisch stimuliert.

Das Problem, gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen, insbesondere bei einem unvollständigen IL-6R, zu beheben, scheint bereits durch D4 gelöst.

Die der Anmeldung zugrundeliegende Aufgabe kann daher nur in der Bereitstellung eines weiteren Mittels zur Lösung dieser Aufgabe gesehen werden, wobei die Bereitstellung dieses weiteren Mittels weniger kosten- und zeitaufwendig sein sollte als in D4.

Die vorliegende Lösung dieser Aufgabe, ein Fusionspolypeptid, in dem IL-6R und IL-6 oder CNFT Rezeptor und CNFT durch ein Polypeptid miteinander verbunden sind, ergibt sich in naheliegender Weise aus der Kombination der Lehren aus D4 und D1 **oder** D2 und D1 **oder** D3 und D1. Daher beruht der Gegenstand der Ansprüche 1-10 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Art. 33 (3) PCT).

- 4). Für die Beurteilung der Frage, ob der Gegenstand des vorliegenden Anspruchs 10 gewerblich anwendbar ist, enthält der PCT keine eindeutigen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.
- 5). In der Beschreibung der vorliegenden Anmeldung sind zwar **a)** Konjugate, in denen der Linker eine Disulfidbrücke sein kann und **b)** Konjugate bestehend aus CNTF-Rezeptor und CNFT formal erwähnt, jedoch enthält die Beschreibung weder Beispiele zur Ausführung dieser Konjugate (**a)**), noch Beispiele, die die tatsächliche Wirksamkeit dieser Konjugate (**b)**) zeigen. Daher scheint der Gegenstand der Ansprüche 1-4 und 5-10, soweit er sich auf Anspruch 1 (Disulfidbrücke) und/oder Anspruch 5 (CNFT) bezieht, nicht ausreichend offenbart und in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt (Art. 5/Art. 6 PCT).

M 29.05.98

Amtl. Aktenzeichen: PCT/DE97/00458
Unser Zeichen: A 2953 - hu / msl

Patentansprüche

1. Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide, wobei das eine Polypeptid ein Zytokin-Rezeptor und das andere ein Zytokin als Ligand ist und die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke oder ein Polypeptid ist.
2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor in Form seiner den Liganden bindenden Untereinheit vorliegt.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand in Form seiner den Rezeptor bindenden Untereinheit vorliegt.
4. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein IL-6 Rezeptor und das Zytokin ein IL-6 ist.
5. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein CNTF-Rezeptor und das Zytokin ein CNTF ist.
6. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat ein Fusionspolypeptid ist.
7. DNA, kodierend für das Konjugat nach Anspruch 6.
8. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 7.
9. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 8.

10. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1-6 und der DNA nach Anspruch 7 zur Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen.